



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

ANA CARLA DA SILVA CARVALHO DIAS

**EFEITO PROTETOR DA FUCOIDINA, UM INIBIDOR DE P E L-SELECTINA, NA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA E DISTÚRBIOS DE MOTILIDADE
GASTRINTESTINAL NA PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL**

FORTALEZA - CE
2013

ANA CARLA DA SILVA CARVALHO DIAS

**EFEITO PROTETOR DA FUCOIDINA, UM INIBIDOR DE P E L-SELECTINA, NA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA E DISTÚRBIOS DE MOTILIDADE
GASTRINTESTINAL NA PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador:

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza

FORTALEZA - CE

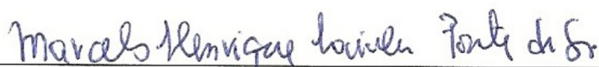
ANA CARLA DA SILVA CARVALHO DIAS

**EFEITO PROTETOR DA FUCOIDINA, UM INIBIDOR DE P E L-SELECTINA, NA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA E DISTÚRBIOS DE MOTILIDADE
GASTRINTESTINAL NA PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL**

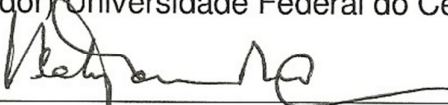
Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca setorial da referida Universidade.

Aprovada em 08/03/2013

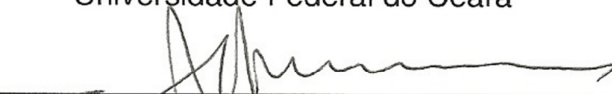
BANCA EXAMINADORA



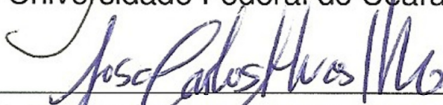
Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza
(Orientador) Universidade Federal do Ceará



Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao
Universidade Federal do Ceará



Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
Universidade Federal do Ceará



Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho
Universidade de São Paulo



Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo
Universidade Federal de Sergipe

**A Deus, pela proteção e bênçãos
concedidas**

**A minha princesa Ana Carollina,
meu esposo Julio Cesar, minha
mãe Maria do Carmo e meus
irmãos Júnior e Ricardo, pelo
amor e apoio incondicional.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza pelo acolhimento no laboratório, pela confiança em mim depositada, pela orientação, incentivo e amizade durante a realização deste trabalho. Meu muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao por todo incentivo, confiança, preocupação e apoio durante toda minha pós-graduação e por participar da minha banca de defesa.

Aos Profs. Drs. Pedro Jorge Caldas Magalhães, José Carlos Farias Alves Filho e Enilton Aparecido Camargo pela disposição em compor a banca de avaliação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto César pela amizade, presteza e disponibilidade em todos os momentos da minha pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Ribeiro, pelo acolhimento no LAFICA e pelo exemplo de competência, dedicação e compromisso com a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares pela colaboração constante e análise histológica dos experimentos.

À Prof^a. Dr^a. Ana Maria Sampaio Assreuy pela simpatia e gentileza em disponibilizar seu laboratório para realização dos experimentos *in vitro*.

A todos os professores do departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos meus amigos da Pós-graduação, em especial Ana Paula Macedo, Deysi Wong e Larisse Lucetti pela amizade e parceria durante os experimentos, a Cínthya e família, Kristiana Mousinho, Silvéria e família, Otacílio e Roberta pela amizade, brincadeiras, festas e aniversários comemorados juntos.

Aos bolsistas do LAFICA, Rhamon e Bruno pelo auxílio e amizade demonstrados nestes meses de convívio saudável e proveitoso.

À Maria Silvandira França Pinheiro (Vandinha) pela atenção, disponibilidade e organização do laboratório LAFICA. À Carol e Karina, pela disponibilidade e ajuda nos experimentos.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, especialmente Aura, pela disponibilidade constante em ajudar.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

"Nas mãos de cada indivíduo encontra-se um poder maravilhoso, para o bem ou para o mal – a influência silenciosa, inconsciente e velada de sua vida. Trata-se simplesmente da radiação constante do que a pessoa realmente é, e não o que ela pretende ser."

(William George Jordan)

RESUMO

Efeito Protetor da Fucoidina, um Inibidor de P e L-Selectina, na Resposta Inflamatória Sistêmica e Distúrbios e Motilidade Gastrointestinal na Pancreatite Aguda Experimental. Autora: Ana Carla da Silva Carvalho Dias. Orientador: Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza. Tese de doutorado em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2013.

Introdução e objetivos: Os neutrófilos desempenham importante papel na pancreatite aguda grave. Infiltração de neutrófilos no pâncreas é um processo complexo, coordenado por moléculas de adesão específicas, tais como a P-selectina. Fucoidina é um polissacarídeo sulfatado que bloqueia a função da L- e P-selectinas. No presente estudo avaliamos se o tratamento com fucoidina poderia impedir a infiltração de neutrófilos e, assim, reverter a inflamação sistêmica e dismotilidades gastrointestinais associadas à pancreatite aguda grave. **Métodos:** A pancreatite aguda foi induzida em camundongos Swiss pela infusão retrógrada de ácido taurolitocólico (3,0%) (TLC-S) no ducto pancreático ou por injeções intraperitoneais de ceruleína (50 µg/kg/h). Os grupos experimentais receberam fucoidina (25 mg/kg, iv) antes da indução da pancreatite, e os grupos de controle receberam apenas solução salina. Após 24 horas, os níveis séricos de amilase, lipase, IL-1β, TNF-α, nitrito e de malondialdeído (MDA) pancreático foram medidos. Além disso, a atividade de mieloperoxidase (MPO) (pulmão, pâncreas, estômago e jejuno) e avaliação histológica (pâncreas) foram determinadas. O esvaziamento gástrico e trânsito gastrointestinal foram medidos pelo método de centro geométrico. A contratilidade gastrointestinal *in vitro* foi registrada através de transdutores de força conectados a sistema computadorizado de aquisição de dados. Carbacol (0,01 µM - 30 µM), KCl 60 mM e estimulação elétrica (0,5-8,0 Hz; 1ms, 40 V), foram aplicados sobre o fundo gástrico e jejuno dos animais 24 horas após a pancreatite induzida por TLC-S. **Resultados:** Os níveis de MDA pancreático, amilase, lipase, nitrito, TNF-α e IL-1β séricos, bem como MPO pancreática e pulmonar estavam aumentados tanto no modelo de pancreatite aguda induzida por TLCS quanto no modelo ceruleína quando comparado aos grupos controle correspondentes. Fucoidina reduziu significativamente os níveis aumentados de amilase, lipase, MPO pancreática e pulmonar, MDA, TNF-α, IL-1β e nitrito em ambos os modelos de pancreatite aguda. As mudanças histológicas observadas no pâncreas em ambos os modelos foram significativamente atenuadas pela fucoidina. O modelo de pancreatite aguda induzida por TLC-S induziu retardo no esvaziamento gástrico e trânsito gastrointestinal, aumento de MPO no estômago e no jejuno, além de hipercontratilidade de jejuno *in vitro*. Fucoidina reverteu significativamente os distúrbios gastrointestinais *in vivo* e *in vitro* e os níveis aumentados de MPO gástrica e jejunal induzidos pela injeção de TLC-S. **Conclusão:** Fucoidina reduziu a gravidade da pancreatite aguda experimental através da diminuição da infiltração de neutrófilos, inflamação sistêmica e dismotilidades gastrointestinais, sugerindo que a modulação das selectinas, pode constituir uma abordagem terapêutica promissora para pancreatite aguda.

Palavras-chave: Pancreatite aguda, fucoidina, L-selectina, P-selectina, neutrófilos

ABSTRACT

Protective Effect of Fucoidan, a P and L-Selectin Inhibitor, in Systemic Inflammatory Response and Gastrointestinal Motility Disorders in Acute Pancreatitis. Author: Ana Carla da Silva Carvalho Dias. Advisor: Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza. Ph. D. Thesis in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, 2013.

Background & Aims: Neutrophils play a critical role in severe acute pancreatitis. Tissue infiltration of neutrophils in the pancreas is a multistep process, coordinated by specific adhesion molecules, such as P-selectin. Fucoidin is a sulphated fucosylated polysaccharide that binds to and blocks the function of L- and P-selectins, and the present study has evaluated whether fucoidin treatment could prevent neutrophil infiltration, and thereby reverse the systemic inflammation and gastrointestinal dysmotility associated with severe acute pancreatitis. **Methods:** Acute pancreatitis was induced in Swiss mice either by the retrograde infusion of taurochenodeoxycholic acid (3.0%) (TLC-S) into the pancreatic duct or by intraperitoneal injections of cerulein (50 µg/kg/h). The experimental groups received fucoidan (25 mg/kg, i.v.) before pancreatitis induction whilst control groups received only saline. After 24 hours, pancreatic malondialdehyde (MDA), serum amylase, lipase, IL-1β, TNF-α and nitrite were measured. In addition, myeloperoxidase (MPO) activity (lung, pancreas, stomach and jejunum) and histological assessment (pancreas) were determined. Gastric emptying and gastrointestinal transit (using the geometric center method) were also measured. Gastrointestinal contractility *in vitro* was recorded through force transducers coupled to a computerized data acquisition system, carbachol (0,01 µM – 30 µM), KCl 60mM and electrical field stimulation (0.5-8.0 Hz; 1ms; 40 V), was applied on gastric fundus and jejunum of mice 24 hours after TLC-S induced pancreatitis. **Results:** Pancreatic MDA, serum amylase, lipase, nitrite, TNF-α and IL-1β, pancreatic and lung MPO, were increased in both TLC-S- and cerulein acute pancreatitis compared with respective control groups. Fucoidan significantly decreased the augmented levels of amylase, lipase, pancreatic and lung MPO, MDA, TNF-α, IL-1β and nitrite in both acute pancreatitis models. Pancreas histological changes observed in both models were significantly attenuated by fucoidan. The acute pancreatitis model induced by TLC-S caused delayed gastric emptying and gastrointestinal transit, increased gastric and jejunum MPO, and jejunum hypercontractility *in vitro*. Fucoidan significantly reversed the gastrointestinal disorders *in vivo* and *in vitro* and augmented levels of gastric and jejunum MPO induced by TLC-S. **Conclusion:** Fucoidan reduced the severity of acute pancreatitis in mice by decreasing neutrophil infiltration, systemic inflammation and gastrointestinal dysmotility, suggesting that modulation of selectins may constitute a promising therapeutic approach for acute pancreatitis.

Key Words: Acute pancreatitis, fucoidan, L-selectin, P-selectin, neutrophil

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	O pâncreas exócrino e endócrino	17
Figura 2	Evolução da pancreatite aguda	21
Figura 3	Sequência de eventos envolvidos na patogênese da pancreatite aguda	25
Figura 4	Processo de interação leucócito-endotélio	29
Figura 5	Curso temporal da ativação de células acinares e o papel regulatório dos neutrófilos sobre a ativação do tripsinogênio	30
Figura 6	Procedimento cirúrgico para indução de pancreatite aguda por infusão retrógrada de TLC-S	40
Figura 7	Esquema simplificado dos equipamentos utilizados nos experimentos de contratilidade <i>in vitro</i>	47
Figura 8	Efeito da fucoidina sobre os níveis de amilase sérica na pancreatite aguda	49
Figura 9	Efeito da fucoidina sobre os níveis de lipase sérica na pancreatite aguda	50
Figura 10	Efeito da fucoidina sobre a atividade de MPO pancreática na pancreatite aguda	51
Figura 11	Efeito da fucoidina sobre a atividade de MPO pulmonar na pancreatite aguda	52
Figura 12	Efeito da fucoidina sobre os danos histológicos pancreáticos na pancreatite aguda induzida por ceruleína	54
Figura 13	Efeito da fucoidina sobre os danos histológicos pancreáticos na pancreatite aguda induzida por TLC-S	55
Figura 14	Efeito da fucoidina sobre os níveis de MDA pancreático na pancreatite aguda	
Figura 15	Efeito da fucoidina no retardo do esvaziamento gástrico de líquidos na pancreatite aguda induzida por TLC-S	61
Figura 16	Efeito da fucoidina sobre o retardo do trânsito intestinal na pancreatite aguda induzida por TLC-S	62
Figura 17	Efeito da fucoidina sobre o centro geométrico da refeição na pancreatite aguda induzida por TLC-S	64

Figura 18	Efeito da fucoïdina sobre a atividade de MPO no estômago e no jejuno na pancreatite aguda induzida por TLC-S	65
Figura 19	Efeito da fucoïdina sobre a contratilidade <i>in vitro</i> do músculo liso do fundo de estômago estimulado por KCl na pancreatite aguda induzida por TLC-S	67
Figura 20	Efeito da fucoïdina sobre a contratilidade <i>in vitro</i> do músculo liso do fundo de estômago estimulado por carbacol na pancreatite aguda induzida por TLC-S	68
Figura 21	Efeito da fucoïdina sobre a contratilidade <i>in vitro</i> do músculo liso do fundo de estômago estimulado eletricamente na pancreatite aguda induzida por TLC-S	69
Figura 22	Efeito da fucoïdina sobre a contratilidade <i>in vitro</i> do músculo liso do jejuno estimulado por KCl na pancreatite aguda induzida por TLC-S	71
Figura 23	Efeito da fucoïdina sobre a contratilidade <i>in vitro</i> do músculo liso do jejuno estimulado por carbacol na pancreatite aguda induzida por TLC-S	72
Figura 24	Efeito da fucoïdina sobre a contratilidade <i>in vitro</i> do músculo liso do jejuno estimulado eletricamente na pancreatite aguda induzida por TLC-S	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tratamento farmacológico da pancreatite aguda. Revisão de drogas testadas em modelos animais experimentais e triagem clínica	23
Tabela 2	Efeito da fucoidina sobre os danos histológicos pancreáticos na pancreatite aguda	56
Tabela 3	Efeito da fucoidina sobre os níveis de TNF- α , IL-1 β e nitrito na pancreatite aguda	58

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
µg	Micrograma
AMPc	Adenosina Monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
Ca ²⁺	Íon cálcio
CCK	Colecistocinina
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
cols	Colaboradores
COX	Ciclooxigenases
CPRE	Colangiopancreatografia retrógrada endoscópica
D.O.	Densidade óptica
E.P.M.	Erro padrão da média
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EROS	Espécies reativas do oxigênio
et al.	...E colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
ex	Exemplo
FAEEs	Ácido graxo etil éster sintetase
FAs	Ácidos graxos
GRP	Peptídeo liberador de gastrina
h	Hora
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
ICAM-1	Molécula 1 de adesão intercelular
IFN-γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IL-12	Interleucina 12
IL-1ra	Antagonista da Interleucina 1β
IL-1β	Interleucina 1β
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
KCl	Cloreto de potássio
kg	Quilograma
L	Litros
LPS	Lipopolissacrídeo
M	Molar
MDA	Malonilaldeído
mg	Miligrama
min.	Minuto
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
mL	Mililitro
MPO	Mieloperoxidase
N	Normal
NAC	N-acetilcisteína
NANC	Não-adrenérgico não-colinérgico
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetros
nM	Nanomolar
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal

NO	Óxido nítrico
NO ²⁻	Nitrito
NO ³⁻	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
°C	Grau centígrado
p	Nível de significância
P.A.	Para análise
p.ex.	Por exemplo
PAF	Fator de agregação plaquetária
PBS	Tampão fosfato salina
rpm	Rotações por minuto
s.c.	Sub-cutâneo
SDMO	Síndrome de disfunção múltipla de órgãos
SNE	Sistema nervoso entérico
SPINK1	Serino protease Kazal tipo 1
SRIS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TGI	Trato gastrointestinal
TLC-S	Ácido taurolitocólico
TNB	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
U.S.A.	United States of America
UFC	Universidade Federal do Ceará
VCAM-1	Molécula 1 de adesão da célula vascular
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
α	Alfa
β	Beta
μ g	Microgram
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Pâncreas: considerações iniciais	17
1.2. Pancreatite Aguda.....	19
1.2.1. Fisiopatologia	24
1.2.2. Pancreatite aguda e dismotilidades gastrintestinais.....	30
1.3. Modelos Experimentais de pancreatite aguda	31
1.3.1. Pancreatite aguda induzida por ceruleína.....	32
1.3.2. Pancreatite aguda induzida por infusão retrógrada no canal bileopancreático de ácido biliar	33
1.4. Fucoidina	34
2. OBJETIVOS.....	36
2.1. OBJETIVO GERAL	36
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1. Animais	37
3.2. Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais.....	37
3.3. Drogas e Reagentes	38
3.4. Pancreatite Aguda Induzida por Ceruleína.....	39
3.5. Pancreatite Aguda Induzida por Ácido Taurolitocólico (TLC-S)	39
3.6. Determinação de Amilase e Lipase Sérica.....	41
3.7. Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase (MPO) no Pâncreas, Pulmão, Estômago e Intestino	41
3.8. Avaliação Histopalógica do Pâncreas	42
3.9. Dosagem de Citocinas Séricas (TNF- α e IL-1 β)	42
3.10. Determinação dos Níveis de Nitrito Sérico.....	43
3.11. Determinação da Concentração Pancreática de Malondialdeído.....	43
3.12. Determinação do Esvaziamento Gástrico e do Trânsito Gastrintestinal	44
3.13. Avaliação da Contratilidade de Fundo de Estômago e Jejuno <i>in vitro</i>	45
3.14. Análise Estatística.....	46
4. RESULTADOS.....	48
4.1. Efeito da Fucoidina Sobre os Níveis Séricos de Amilase e Lipase na Pancreatite Aguda.....	48
4.2. Efeito da Fucoidina Sobre a Atividade de MPO Pancreática e Pulmonar na Pancreatite Aguda.....	48

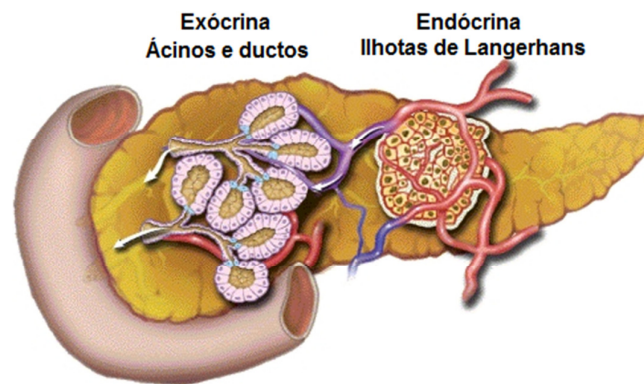
4.3. Efeito da Fucoïdina Sobre os Danos Histol3gicos Pancreáticos na Pancreatite Aguda.....	53
4.4. Efeito da Fucoïdina Sobre os Níveis Séricos de TNF- α e IL-1 β na Pancreatite Aguda.....	57
4.5. Efeito da Fucoïdina Sobre os Níveis Séricos de Nitrito/Nitrato na Pancreatite Aguda.....	57
4.6. Efeito da Fucoïdina Sobre Os Níveis de MDA Pancreático na Pancreatite Aguda.....	57
4.7. Alterações de Motilidade e Atividade de MPO no Trato Gastrintestinal na Pancreatite Aguda Induzida por TLC-S.....	60
4.7.1. Efeito da Fucoïdina Sobre o Retarde no Esvaziamento Gástrico de Líquidos na Pancreatite Aguda Induzida por TLC-S.....	60
4.7.2. Efeito da Fucoïdina Sobre o Retarde no Trânsito Intestinal na Pancreatite Aguda Induzida por TLC-S.....	60
4.7.3. Efeito da Fucoïdina Sobre o Centro Geométrico da Refeição na Pancreatite Aguda Induzida por TLC-S.....	63
4.7.4. Efeito da Fucoïdina Sobre a Atividade de MPO no Estômago e Jejunõ na Pancreatite Aguda Induzida por TLC-S.....	63
4.7.5. Efeito da Fucoïdina Sobre a Contratilidade <i>in vitro</i> do Músculo Liso do Fundo de Estômago na Pancreatite Aguda Induzida por TLC-S.....	66
4.7.6. Efeito da Fucoïdina Sobre a Contratilidade <i>in vitro</i> do Músculo Liso do Jejunõ na Pancreatite Aguda Induzida por TLC-S	70
5. DISCUSSÃO	74
6. CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS.....	86
APÊNDICE – Artigo Submetido (no prelo)	100

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pâncreas: considerações iniciais

O pâncreas humano é uma glândula de aproximadamente 15 cm de extensão localizada atrás do estômago, entre o duodeno e o baço, que possui duas unidades funcionais, a exócrina e a endócrina (Figura 1) (PANDOL, 2010). O pâncreas endócrino consiste das ilhotas de Langerhans, responsáveis pela produção de insulina, glucagon, somatostatina e polipetídeo pancreático, que atuam na manutenção da homeostasia da glicose. O pâncreas exócrino corresponde a cerca de 85% da massa total do pâncreas e suas funções primárias são a síntese e secreção dos componentes enzimáticos e aquosos do suco pancreático, responsáveis pela digestão dos alimentos e pela neutralização dos conteúdos duodenais (LEUNG & IP, 2006; PANDOL, 2010).

Figura 1 – O pâncreas exócrino e endócrino



Fonte: Adaptado de Pandol (2010)

A unidade funcional do pâncreas exócrino é composta pelos ácinos e ductos. O sistema ductal estende-se desde o lúmen do ácino até o duodeno. As células acinares dos ácinos são especializadas em sintetizar, armazenar e secretar enzimas digestivas. Em sua membrana basolateral existem receptores para hormônios e neurotransmissores que estimulam a secreção enzimática. A célula acinar possui

retículo endoplasmático rugoso abundante para a síntese de proteínas e sua região apical contém grânulos de zimogênio (PANDOL, 2010).

A síntese das enzimas ocorre nos ribossomos do retículo endoplasmático, sendo transportadas nas vesículas de transporte para o Aparelho de Golgi, onde são separadas em diferentes grupos, segundo a sua função (WHITCOMB et al., 1999). Tripsinogênio é uma enzima chave que, quando ativado em tripsina, funciona como autocatalizadora e desencadeia a ativação das pró-enzimas restantes (RARATY et al., 2005). As enzimas digestivas têm o potencial de causar significativo dano celular pancreático, por esta razão existe uma série de mecanismos para proteger a célula acinar. Estes mecanismos incluem a produção, armazenamento e secreção das enzimas sob a forma de pró-enzimas inativas ou zimogênios (ex. tripsinogênio, quimiotripsinogênio procarboxipeptidase e pró-elastase), que são ativadas apenas no duodeno pela ação de enteroquinases presentes na borda em escova das células da mucosa duodeno-jejunal (RARATY et al., 2005). A célula acinar contém um inibidor serinoprotease Kazal tipo 1 (SPINK1), que está presente em quantidade suficiente para inibir cerca de 20% da atividade potencial de tripsina através da inibição competitiva do domínio catalítico da tripsina (HIROTA et al., 2006). Outro mecanismo envolve a inativação por clivagem da tripsina, quer através de autólise ou de ações da mesotripsina e enzima Y (RARATY et al., 2005). A última linha de defesa à cascata de ativação das proteases é a inibição pela α 2-macroglobulina, α 1-antitripsina, anti-quimiotripsina, inter-a-tripsina e C1 esterase que estão presentes em abundância no interstício pancreático (VEGE & CHARI, 2007).

O transporte e liberação do conteúdo dos grânulos de zimogênio ocorrem através de exocitose. Receptores para colecistocinina (CCK), acetilcolina, peptídeo liberador de gastrina (GRP), substância P, peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e secretina foram identificados na membrana basolateral da célula acinar (PANDOL, 2010). A ligação da secretina e do VIP aos seus receptores específicos nas células acinares promove a ativação da adenilato ciclase e aumento do AMPc celular, com subsequente ativação da proteína quinase A culminando com a secreção das enzimas (WILLIAMS, 2001; PANDOL, 2010). Acetilcolina, GRP, substância P e CCK atuando em seus receptores promovem a secreção enzimática com envolvimento das vias de sinalização de inositol trifosfato/diacilglicerol, que elevam a concentração de Ca^{2+} intracelular, com subsequente desencadeamento da exocitose dependente

de Ca^{2+} (WASLE e EDWARDSON, 2002). Tais mecanismos representam mecanismos fisiológicos para a secreção dos grânulos de zimogênio. Uma falha nesse contexto constitui eventos intracelulares que desencadeiam a pancreatite aguda, visto que, nessa condição, a injúria e ruptura dos ácinos pancreáticos permitem a exposição das enzimas pancreáticas ao tecido e os subsequentes efeitos inflamatórios (BATHIA et al., 2005; PANDOL, 2010).

1.2. Pancreatite Aguda

No final do século XIV e início do século XX diversos pesquisadores, como Rugero Oddi e Claude Bernard, descreveram detalhes da anatomia biliopancreática e sua fisiologia. Estes estudos culminaram com os trabalhos publicados por Reginald H. Fitz e H. Chiari (FITZ, 1898; CHIARI, 1896), que inauguraram o estudo da pancreatite aguda e suas complicações. Desde então, considerável esforço vem sendo empregado no estudo da sua fisiopatologia e tratamento. A pancreatite aguda, definida atualmente como um processo inflamatório agudo do pâncreas, com envolvimento variável de outros tecidos regionais ou sistemas de órgãos remotos (definição do Simpósio Internacional de Atlanta, 1992), é caracterizada pela presença de edema pancreático, hemorragia, necrose acinar e lipídica, assim como inflamação e infiltração perivascular do pâncreas, podendo ainda atingir outros órgãos como fígado e pulmões (TATTERSALL et al., 2008).

A pancreatite aguda apresenta uma incidência que varia de um país para outro entre 5-100 casos para cada 100.000 habitantes, devido a distribuição desigual dos principais fatores de risco da doença, como ocorrência de cálculo biliar e consumo excessivo de álcool (HAJJAL et al., 2012). Nos Estados Unidos da América e norte da Europa a etiologia alcoólica predomina, enquanto que no sul da Europa a principal causa de pancreatite aguda é a biliar (GULLO et al., 2002). No Brasil, pancreatite foi responsável por mais de 27077 internações hospitalares em 2006, com mais de 1400 mortes por ano, o que representou um custo financeiro de R\$ 12 milhões naquele ano (CAMPOS et al., 2008). A pancreatite aguda é geralmente leve e autolimitada, no entanto, cerca de 20% dos pacientes desenvolvem a forma grave da doença, caracterizada pelo aparecimento de complicações locais, como necrose

e superinfecção, e sistêmicas através do desenvolvimento da síndrome de disfunção múltipla de órgãos. A mortalidade na forma grave da pancreatite aguda é de 7 a 15% (HAJJAL et al., 2012). Este percentual aumenta substancialmente com a presença da síndrome de disfunção múltipla de órgãos. Desta forma, a taxa de mortalidade dos pacientes com pancreatite aguda grave acompanhada por insuficiência respiratória, insuficiência renal e hepática é de 43%, 63% e 83%, respectivamente (HALONEN et al., 2002; HAJJAL et al., 2012).

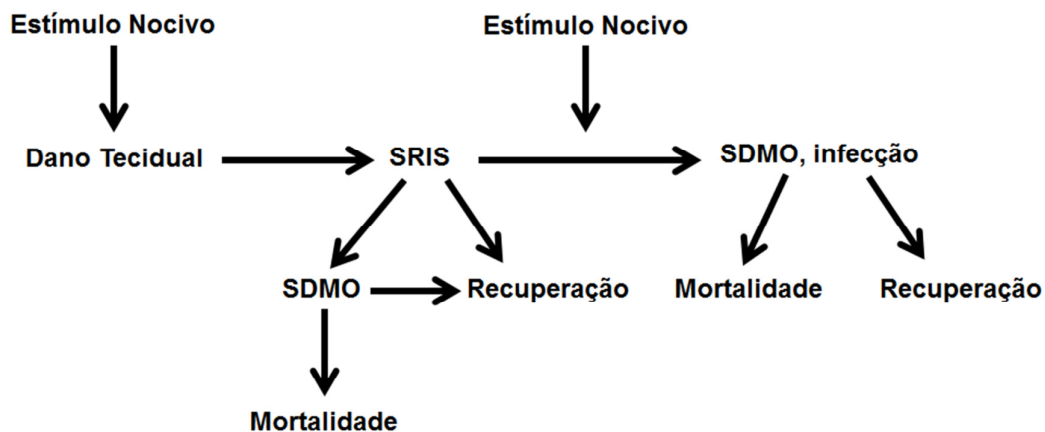
A causa mais comum de pancreatite aguda no cenário clínico, responsável por cerca de 30 a 50% dos casos, é a obstrução biliar, geralmente microlitíase (TOOULI et al., 2002). A litíase biliar desencadeia a auto-digestão pancreática, provavelmente, por obstrução transitória do ducto pancreático, pela passagem de um cálculo através da ampôla de Vater. Esta obstrução leva a um aumento transitório da pressão no canal de Wirsung, com extravasamento de suco pancreático para o interstício glandular e conseqüente lesão (ROSA et al, 2004). O alcoolismo é a segunda causa mais comum, e a pancreatite alcoólica recorrente leva à pancreatite crônica (AMMANN & MUELLHAUPT et al., 1994). O mecanismo de lesão induzido pelo álcool é menos claro. As hipóteses propostas incluem: toxicidade pancreática direta, estimulação da secreção pancreática (secundária a um aumento de secreção gástrica) com aumento da pressão intra-ductal, espasmo do esfíncter de Oddi, aumento da permeabilidade do ducto pancreático, aumento da concentração proteica no suco pancreático com precipitação nos pequenos ductos glandulares e hipoperfusão pancreática (ROSA et al, 2004). Infecção, resposta auto-imune, trauma, drogas, procedimentos endoscópicos, hiperlipidemia e hiperparatireoidismo representam apenas 10% dos casos dessa doença (LOVE et al., 2009; FRANCO et al., 2009).

A dor abdominal constitui a manifestação mais característica da pancreatite, cuja intensidade varia de ligeira e desconfortável a intensa e incapacitante, inicialmente pode ser epigástrica e peri-umbilical podendo irradiar para o dorso ou para todo o abdômen. Náuseas e vômitos, acompanhados de parada na eliminação de gases e fezes também estão presentes (TATTERSALL et al., 2008). O paciente pode ainda apresentar febre, hipotensão, alteração respiratória e distensão abdominal (CARROLL et al., 2007). O diagnóstico de pancreatite aguda é realizado quando estão presentes ao menos duas das seguintes características: (1) dor abdominal

consistente com pancreatite aguda (início agudo de dor epigástrica grave e persistente, muitas vezes irradiando para as costas), (2) aumento dos níveis séricos de lipase (ou amilase) para, pelo menos, três vezes o limite superior do normal, e (3) achados característicos na tomografia computadorizada e, menos frequente, na ressonância magnética, ou ultrassonografia transabdominal (BANKS et al., 2013).

Atualmente duas fases podem ser definidas na pancreatite aguda, uma inicial e uma tardia. A fase inicial, que dura normalmente uma semana, é seguida por uma segunda fase que tem uma duração variável de semanas a meses. Durante a fase inicial as manifestações apresentadas resultam da resposta do organismo à lesão pancreática local, apresentando-se clinicamente como a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS). Esta fase inicial geralmente dura até ao fim da primeira semana, mas pode estender-se para a segunda semana. A fase tardia é caracterizada pela persistência de sinais sistêmicos de inflamação ou pela presença de complicações locais. A síndrome de disfunção múltipla de órgãos (SDMO) é o principal determinante da gravidade, de modo que a caracterização de pancreatite aguda na fase tardia requer critérios clínicos e morfológicos (Figura 2) (BANKS et al., 2013).

Figura 2 – Evolução da pancreatite aguda



Fonte: Aaptado de Zhou e cols (2010)

Não existe terapia específica para pancreatite aguda, sendo seu tratamento voltado para o alívio dos sintomas e prevenção ou tratamento das complicações

(KYLANPAA et al., 2012). Na forma mais leve da doença, a terapia é de suporte e inclui a reposição de líquido, alívio da dor, administração de oxigênio, antieméticos e atenção às necessidades nutricionais (CARROLL et al., 2007; FROSSARD et al., 2008). Na pancreatite grave, a necessidade de monitorização e suporte hemodinâmico, respiratório, renal e hepato-biliar implica o internamento em unidade de cuidados intensivos. Mais uma vez, a reposição de fluidos é essencial (ROSA et al., 2004).

A infecção da necrose pancreática é uma complicação que se desenvolve em 40-70% dos pacientes durante a segunda ou terceira semana, sendo uma causa de mortalidade. Apesar de existirem divergências quanto ao benefício da profilaxia com antibióticos no tratamento da pancreatite aguda, quando na presença de infecção o tratamento é realizado com o uso de antibióticos (p.ex. carbapenemas, fluoroquinolonas associado a metronidazol, cefalosporinas de 3^a. geração associado a metronidazol e vancomicina) (BANKS et al., 2006; FROSSARD et al., 2008). Bang e cols (2008) publicaram um artigo de revisão sumarizando os resultados da utilização de várias drogas na prevenção e tratamento da pancreatite aguda clínica e experimental (**Tabela 1**).

A intervenção cirúrgica ficou reservada para os casos de infecção da necrose pancreática, diagnosticada por tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética e, principalmente, por punção com agulha fina (SARR et al., 1991). Também se reserva a intervenção cirúrgica aos pacientes graves, com insuficiência de múltiplos órgãos, que não apresentaram melhora após 72 horas de cuidados intensivos (BEGER et al., 1985; BRANUM et al., 1998; RANSON, 1997). Quanto à intervenção sobre a necrose não infectada, esta deve ser postergada ao máximo, se possível depois da terceira semana, e para sua abordagem diversas modalidades cirúrgicas podem ser empregadas (TRIVINO et al., 2002).

Embora muito se discuta quanto ao valor da colangiopancreatografia retrógrada endoscópica (CPRE) e papilotomia endoscópica, estas estão bem indicadas em doentes com obstáculo ao nível da ampola biliopancreática, seja por cálculo, seja por processo inflamatório, particularmente na vigência de colangite (NEOPTOLEMOS et al., 1988).

Tabela 1- Tratamento farmacológico da pancreatite aguda. Revisão de drogas testadas em modelos animais experimentais e triagem clínica

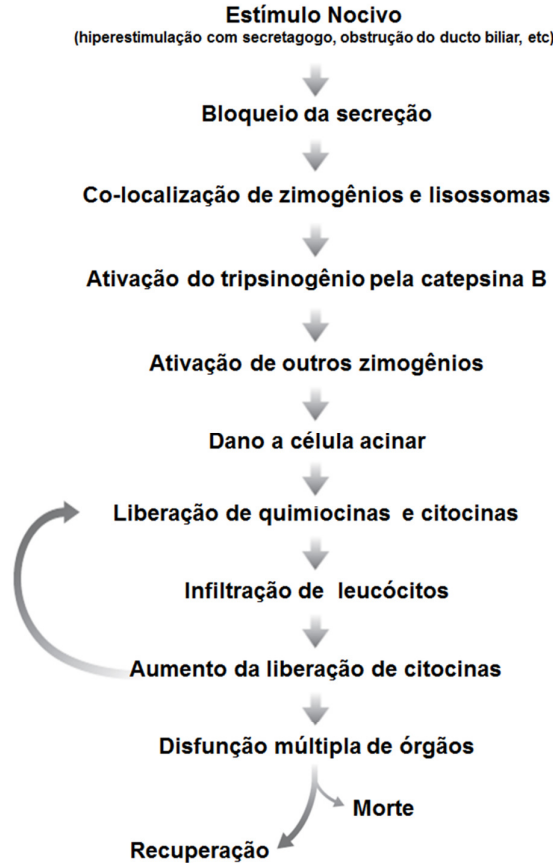
Nome	Mecanismo de ação	Efeito em modelos animais	Resultados em triagens humanas
Somatostatina	Inibição da secreção pancreática	Não reduz a mortalidade	Não reduz a mortalidade
Octreide	Inibição da secreção pancreática	Não tem efeito (resultados divergentes)	Não reduz a mortalidade
Mesilato de gabexato	Inibidor de protease	Redução dos escores histológicos	Pode reduzir a mortalidade
N-acetil-cisteína	Redução do estresse oxidativo	Reduz a gravidade	Não reduz a mortalidade
Óxido de nitrogênio	Melhora da microcirculação	Redução do edema	Dados não publicados
Esteróides	Anti-inflamatório não-específico	Redução da mortalidade	Dados não publicados
Interleucina 10	Anti-inflamatório	Redução da mortalidade	Dados não publicados
Anticorpo anti-TNF-α	Anti-inflamatório específico	Redução da mortalidade	Dados não publicados
Inibidor de PAF	Anti-inflamatório específico	Não reduz a mortalidade	Não reduz a mortalidade
Antibióticos	Antibacteriano	-	Redução da mortalidade
Probióticos	Prevenção da colonização do intestino	-	Não reduz a mortalidade

Fonte: Modificado de Bang e cols (2008).

1.2.1. Fisiopatologia

Os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da pancreatite aguda e a forma como as diversas etiologias conduzem a um processo comum de inflamação são ainda pouco compreendidos. A sequência de eventos envolvidos na patogênese da pancreatite aguda está representada na Figura 3. Um dos primeiros eventos, que é comum às diferentes etiologias da pancreatite, é o bloqueio da secreção de enzimas pancreáticas, enquanto a síntese continua (SALUJA et al., 2007). Após o estímulo nocivo inicial o tripsinogênio é convertido em tripsina dentro das células acinares pancreáticas. Ocorre co-localização de enzimas lisossomais, tais como a catepsina B, e enzimas digestivas, incluindo tripsinogênio, em vacúolos instáveis dentro da célula acinar (PANDOL et al., 2007). Na célula acinar normal, estes dois grupos de enzimas são cuidadosamente armazenados pelo Aparelho de Golgi, porém, na pancreatite aguda a catepsina B cliva o peptídeo de ativação de tripsinogênio dentro dos vacúolos acinares, promovendo a ativação intrapancreática de tripsina que é liberada em quantidade suficiente para ultrapassar os mecanismos normais de defesa do pâncreas (BATHIA et al., 2005). Além disso, a liberação de tripsina intrapancreática leva à ativação de mais de tripsina, e outras enzimas pancreáticas, como a fosfolipase, quimotripsina e elastase. A tripsina também promove a ativação de outras cascatas, incluindo o complemento, cinina-caliceína, coagulação e fibrinólise (ELFAR et al., 2007). Esta liberação intrapancreática de enzimas ativas leva a autodigestão do pâncreas, criando um ciclo vicioso de enzimas ativas promovendo dano celular, que depois liberam mais enzimas ativas causando dano em toda glândula e no tecido peripancreático (BATHIA et al., 2005). Adicionalmente, radicais livres de oxigênio, liberados secundariamente a injúria pancreática, causam inativação dos inibidores de protease circulantes, contribuindo para o acúmulo de proteases ativadas no tecido pancreático (ELFAR et al., 2007).

Figura 3 - Sequência de eventos envolvidos na patogênese da pancreatite aguda



Fonte: Adaptado de Saluja e cols (2007)

A liberação das enzimas pancreáticas danifica o endotélio vascular e o interstício, bem como as células acinares. Alterações na microcirculação, incluindo vasoconstrição, estase capilar, diminuição da saturação de oxigênio e isquemia progressiva levam ao aumento da permeabilidade vascular e inchaço da glândula. A lesão vascular pode causar insuficiência na microcirculação local e amplificação da lesão pancreática (MOFLEH, 2008). As alterações pancreáticas levam a um aumento das concentrações intracelulares de cálcio, com a redução do pH intracelular, ambos causando ativação prematura do tripsinogênio (ELFAR et al., 2007). A liberação de cálcio intracelular desempenha um papel central na patogênese da pancreatite aguda induzida por diversos agentes, incluindo ceruleína (KRUGER et al., 2000; RARATY et al., 2000), sais biliares (KIM et al., 2002; VORONINA et al., 2002), metabólitos alcoólicos não oxidativos (etil ésters de ácidos graxos, FAEEs) e ácidos graxos (FAs) (CRIDDLE et al., 2004; CRIDDLE et al.,

2006). O aumento global de Ca^{2+} induzido por esses agentes leva a uma ativação cálcio-dependente dos grânulos de zimogênio, formação de vacúolos e necrose (KRUGER; ALBRECHT *et al.*, 2000; RARATY; WARD *et al.*, 2000).

A gravidade e a duração do estresse aplicado às células acinares pancreáticas determinam o tipo de morte celular na pancreatite aguda (CRIDDLE *et al.*, 2007). A morte das células acinares ocorre principalmente através de apoptose, autofagia ou necrose, sendo os dois primeiros considerados predominantemente como mecanismos de proteção, enquanto a necrose promove um processo inflamatório, que pode tornar-se sistêmico, causando danos em órgãos remotos e mortalidade (BOOTH *et al.*, 2011). A gravidade da pancreatite experimental está diretamente correlacionada com a extensão da necrose e inversamente com a apoptose (SUNG *et al.*, 2009). Clinicamente, a extensão da necrose determina a gravidade e o desfecho da doença. A necrose parenquimatosa é uma importante causa de complicações graves e mortalidade na pancreatite em humanos (SUNG *et al.*, 2009; GERASIMENKO E GERASIMENKO *et al.*, 2012).

Acredita-se que os eventos que ocorrem após a lesão acinar determinam a gravidade da pancreatite. As células acinares também sintetizam e liberam citocinas e quimiocinas, promovendo o recrutamento de células inflamatórias tais como neutrófilos e macrófagos. A ativação de granulócitos e macrófagos promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral, interleucinas 1, 6 e 8), metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, fator ativador de plaquetas e leucotrienos), enzimas proteolíticas e lipolíticas, além de espécies reativas de oxigênio que alteram a microcirculação pancreática para aumentar a permeabilidade vascular e induzir trombose e hemorragia, levando a necrose pancreática (BATHIA *et al.*, 2005). A razão que leva estes eventos a ficarem circunscritos em alguns doentes e sejam amplificados em outros permanece obscura (MOFLEH, 2008). Estas complicações podem resultar de uma exagerada e descontrolada resposta do organismo levando ao desenvolvimento da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (HAJJAR *et al.*, 2012). A síndrome da disfunção múltipla de órgãos é aparentemente induzida por citocinas e mediadores inflamatórios liberados durante a resposta inflamatória sistêmica (MOFLEH, 2008).

As citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) desempenham papel significativo na patogênese da pancreatite aguda e suas complicações sistêmicas

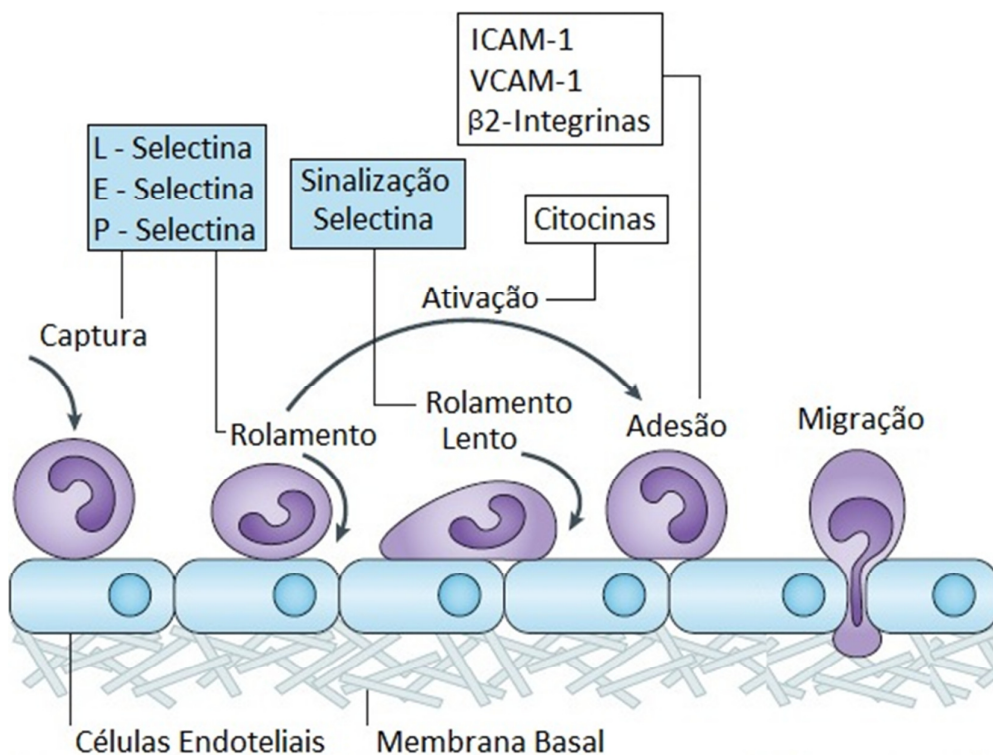
(GRANGER e REMICK, 2005). Estas citocinas são liberadas na circulação, através da veia porta, exacerbando a resposta inflamatória. Os níveis de TNF- α e IL-1 β estão elevados no início e durante o progresso da pancreatite aguda e sua inibição atenua a gravidade da pancreatite em diferentes modelos experimentais (NORMAN et al., 1995; HIROTA et al., 2000; BHATIA et al., 2005). Estudos têm demonstrado que o bloqueio de TNF- α em modelos experimentais melhora diversos parâmetros da pancreatite aguda. A neutralização do TNF- α com um anticorpo policlonal reduziu a gravidade da pancreatite aguda experimental induzida pela infusão de ácido biliar (GREWAL et al, 1994; HUGHES et al., 1996). Estudos de Malleo e cols (2008) mostraram que o tratamento com talidomida, um inibidor de TNF- α , reduz o dano pancreático, a produção de TNF- α e IL-1 β , a expressão de moléculas de adesão e a infiltração de neutrófilos. O uso de IL-1ra, antagonista dos receptores de IL-1 β , no tratamento da pancreatite aguda, promoveu uma redução significativa na mortalidade (TANAKA et al., 1995). Além disso, o uso de moléculas que inibem a produção de várias citocinas, incluindo IL-1 β , têm sido utilizadas para atenuar a gravidade da pancreatite aguda (DENHAM et al., 1997). Estas citocinas aumentam a permeabilidade capilar de todo organismo, intensificando a perda de fluidos e favorecendo a migração intratissular de leucócitos com ativação de neutrófilos e monócitos que liberam enzimas proteolíticas e radicais livres, destruindo o endotélio vascular assim como as células do parênquima (MOFLEH, 2008; KYLANPAA et al.,2012). Além disso, esses mediadores inflamatórios também podem afetar a microcirculação intestinal levando a danos das microvilosidades e permitindo endotoxemia e translocação bacteriana para a circulação sistêmica aumentando o risco de infecção do pâncreas (MOFLEH, 2008). Esse fenômeno, acompanhado da deficiência de oxigênio celular, leva à disfunção de órgãos vitais, seguida de completa falência, sendo órgãos como pulmões, coração e rins os mais afetados. A progressão desses eventos explica as mortes prematuras na pancreatite aguda (HAJJAR et al., 2012).

Evento fundamental durante a pancreatite aguda é a acumulação de neutrófilos no pâncreas, etapa que modula a gravidade tanto dos eventos locais, bem como das manifestações sistêmicas da pancreatite (PANDOL et al., 2007; AWLA et al., 2011). A liberação de diversas quimiocinas direciona a migração de neutrófilos para os locais onde o dano tecidual está presente (ZHANG et al., 2001). Por exemplo, a

proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-2 é um potente quimioatraente para neutrófilos e desempenha um papel importante na pancreatite aguda (PASTOR et al., 2003). Contudo, o conhecimento dos mecanismos moleculares que regulam o recrutamento de leucócitos no pâncreas ainda é limitado.

O acúmulo de neutrófilos no foco da inflamação é um evento complexo controlado por moléculas de adesão específicas das famílias das selectinas e das integrinas. Vários estudos demonstraram que o processo inicia-se com o rolamento dos neutrófilos no endotélio ativado, seguida de adesão firme e migração transendotelial para o espaço extravascular (Figura 4) (WAGNER e ROTH, 2000). As células endoteliais ativadas expressam altos níveis de moléculas de adesão da família das selectinas, molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1), molécula 1 de adesão da célula vascular (VCAM-1) e integrinas. A ativação endotelial é ocasionada por subprodutos de micro-organismos, citocinas (IL-1, TNF- α), componentes ativados do sistema complemento, entre outros. As selectinas são glicoproteínas presentes em leucócitos (L-selectina), endotélio (E-selectina e P-selectina) e plaquetas (P-selectina) que se ligam a moléculas glicosiladas presentes na superfície de outras células e, em geral, medeiam adesão de baixa afinidade entre leucócitos e endotélio. Apesar da baixa afinidade, essa interação é suficiente para atrair os leucócitos para a periferia e promover contato com o endotélio. Tomando como exemplo um neutrófilo, seu primeiro contato com o endotélio ativado é mediado pela interação das selectinas P e E no endotélio à mucina presente na sua superfície. Concomitantemente, a selectina L, de expressão constitutiva nos neutrófilos, liga-se ao conjunto de mucinas na superfície do endotélio. Essas ligações são de dissociação rápida, o que faz com que os neutrófilos rolem na parede do vaso impelidos pelo fluxo sanguíneo e sejam expostos a fatores quimiotáticos (LEY et al, 2007; BORREGAARD, 2010). Estes mecanismos de rolamento e migração de neutrófilos ainda não foram estudados em detalhes no pâncreas.

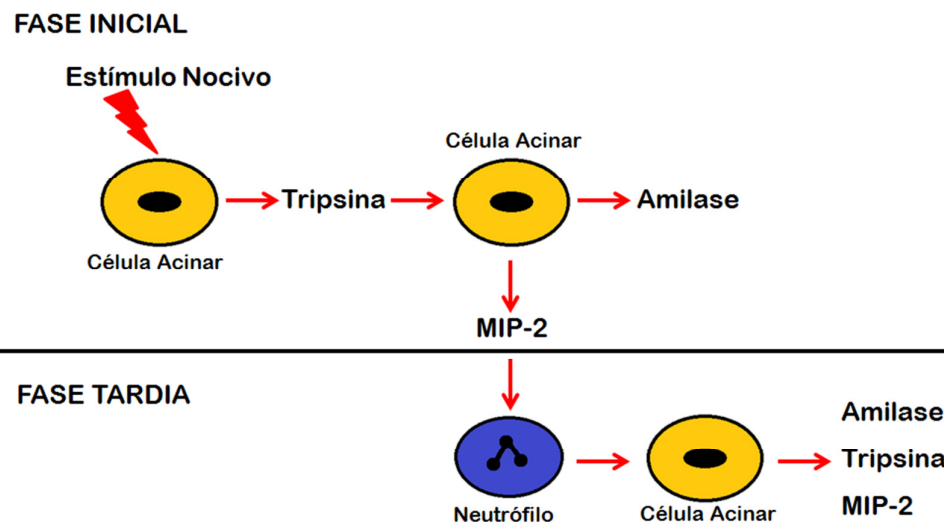
Figura 4 - Processo de interação leucócito-endotélio



Fonte: Modificado de Ley e cols (2007)

Dados da literatura mostram que a depleção de neutrófilos, induzida pela administração de soro anti-neutrófilo, reduz a gravidade e o dano pulmonar associado à pancreatite induzida experimentalmente (FROSSARD et al., 1999; GUKOVSKAYA et al., 2002). Estudos recentes demonstraram que a depleção de neutrófilos pelo uso de um anticorpo monoclonal reduziu o dano tecidual durante a pancreatite aguda, porém, não teve nenhum efeito sobre a ativação inicial de tripsinogênio, sugerindo que a ativação proteolítica no pâncreas é um processo dinâmico caracterizado por uma fase inicial independente de neutrófilos e uma fase tardia, dependente de neutrófilos (Figura 5) (ABDULLA et al., 2011)

Figura 5 – Curso temporal da ativação de células acinares e o papel regulatório dos neutrófilos sobre a ativação do tripsinogênio



Fonte: Modificado de Abdulla e cols (2011)

O rolamento de neutrófilos mediado por P-selectina tem sido descrito como fator fundamental no processo de extravasamento de neutrófilos na pancreatite aguda, além disso, a expressão de P-selectina encontra-se aumentada em diversos modelos experimentais de pancreatite aguda (ABDULLA *et al*, 2012; HARTMAN *et al*, 2012). No entanto, são necessários maiores estudos sobre o papel das selectinas, a migração de neutrófilos e os danos associados à pancreatite aguda.

1.2.2. Pancreatite aguda e dismotilidades gastrintestinais

Diversas evidências clínicas sugerem que a pancreatite aguda necrotizante promove íleo paralítico, mas os mecanismos envolvidos nesta disfunção ainda são desconhecidos (SEERDEN *et al.*, 2005). Essa dismotilidade intestinal, ainda sem terapia específica disponível, resulta em disfunção da barreira intestinal, crescimento bacteriano e translocação de bactérias do lúmen intestinal (LIN *et al.*, 2011). As disordens de motilidade gastrintestinal na pancreatite aguda podem ter múltiplas causas. Algumas teorias incluem deficiência de neurônios entéricos, de células musculares e de células intersticiais de Cajal (ZHOU *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2012).

O controle da função motora do trato gastrointestinal é realizado por meio de componentes anatômicos e funcionais, como a própria musculatura lisa gastrointestinal, o sistema nervoso central e o entérico, a ação de hormônios sistêmicos e gastrointestinais, além da homeostase local. Modificações desses componentes podem gerar alterações da função, sendo todos eles, portanto, elementos de interesse na fisiopatologia das dismotilidades gastrointestinais (SCHEMANN et al., 2008; BORNSTEIN et al., 2004).

Diversas evidências na literatura apontam para uma correlação entre as alterações de motilidade e processos inflamatórios do trato gastrointestinal. Estudos de Jonge e cols (2003) mostram que hipomotilidade intestinal e diminuição do esvaziamento gástrico têm sido caracterizadas em modelos de ileite. Outros trabalhos mostram que o óxido nítrico produzido por leucócitos é importante na geração de inflamação intestinal e inibição na motilidade gastrointestinal em modelos de ileite (KALFF, et al., 2000).

Já foi demonstrado experimentalmente que a pancreatite aguda é capaz de induzir retarde do trânsito gastrointestinal (SEERDEN et al., 2005 LIN et al., 2011), contribuindo para o agravamento da doença com aumento dos riscos de desenvolvimento de sepse. Entretanto, maiores estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nessas alterações, bem como a influência dos mediadores inflamatórios produzidos durante a pancreatite aguda sobre a motilidade gastrointestinal.

1.3. Modelos Experimentais de pancreatite aguda

Vários modelos experimentais de pancreatite aguda foram desenvolvidos na tentativa de compreender sua fisiopatologia. Os modelos apresentam vantagens e desvantagens e a seleção de um modelo irá depender do objetivo experimental (CHAN & LEUNG, 2007; ZHANG et al., 2006; PANDOL et al., 2007; FOLCH-PUY, 2007; UHLAMNN et al., 2007; HE et al., 2007). Dentre os modelos experimentais de pancreatite aguda podemos citar aqueles induzidos por altas doses de L-arginina, pela administração de CCK ou de seu análogo ceruleína, por dieta deficiente em colina e suplementada com etionamida, pela perfusão/injeção no ducto pancreático

de sais biliares, pela ligação do ducto biliopancreático ou por indução de alterações vasculares pancreáticas (GRANGER & REMICK, 2005; CHANG & LEUNG, 2007). A seguir detalhamos os modelos selecionados para nosso estudo.

1.3.1. Pancreatite aguda induzida por ceruleína

A pancreatite induzida por ceruleína, um análogo da colecistocinina (CCK), promove uma alteração histológica muito semelhante à fase inicial da pancreatite aguda em humanos. A ceruleína pode induzir pancreatite em camundongos, ratos, coelhos, cães e porcos. O modelo é rápido, não-invasivo, reproduzível, sendo bastante utilizado (CHAN & LEUNG, 2007). A ceruleína, agindo através de receptores da CCK, estimula de forma exagerada as células acinares promovendo ativação do tripsinogênio em tripsina, o que resulta em autodigestão pancreática (CHAN & LEUNG, 2007).

Após 24 horas da indução da pancreatite pela administração de ceruleína, observam-se danos ao tecido pancreático caracterizado por infiltrado de células inflamatórias, vacuolização, depleção dos grânulos de zimogênio, necrose de células acinares e edema, assim como mudanças características de parâmetros laboratoriais, tais como, aumento da amilase e lipase séricas, aumento da atividade de mieloperoxidase pancreática e aumento de citocinas pró-inflamatórias (p. ex.: TNF- α e IL-1 β) (MALLEO et al., 2008; GÓMEZ et al., 2006). Nesse modelo são observados aumentos nos níveis de espécies reativas do oxigênio (EROS), TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, ICAM-1, P-selectina, além de alterações histológicas pancreáticas como degeneração celular acinar, edema e infiltrado inflamatório (CUZZOCREA et al., 2002). Outra característica deste modelo experimental é a indução de pancreatite associada a injúria pulmonar em camundongos e ratos, tornando-o um modelo particularmente importante porque a disfunção pulmonar é uma complicação comum, que contribui de forma significativa para o aumento da taxa de mortalidade dos pacientes com pancreatite aguda (PASTOR et al., 2003; CHAN & LEUNG, 2007).

1.3.2. Pancreatite aguda induzida por infusão retrógrada no canal bíleopancreático de ácido biliar

A canulação do ducto pancreático seguida de infusão do agente agressor, constitui outra forma de induzir pancreatite aguda experimentalmente. A base teórica deste modelo experimental pode ser explicada pela observação feita por Opie, em 1901, que sugeriu haver refluxo biliar para dentro do canal pancreático na vigência de obstrução da papila de Vater (teoria do canal comum), dando início ao processo inflamatório no pâncreas (AHO et al., 1980; SENNINGER, 1992). Uma vez que a cânula tenha sido implantada, uma substância exógena pode ser infundida no pâncreas através do sistema ductal pancreático (CHAN e LEUNG, 2007). Em 1906, Flexner e cols relataram que a pressão intrapancreática anormalmente alta produzida pelo processo de infusão pode induzir necrose aguda, com deterioração que diferiu da observada em pancreatite clínica. O dano foi tão grave e foi produzido tão rapidamente que tornava inviáveis futuras investigações.

Desde aquele tempo, diversas modificações têm sido feitas para tornar o modelo mais semelhante à situação clínica, em termos de etiologia, morfologia do pâncreas e fisiopatologia. Como resultado, a pancreatite aguda induzida por perfusão ductal é hoje um modelo de pancreatite aguda necro-hemorrágica bem estabelecido, confiável e altamente reprodutível com relevância clínica. Ele requer a canulação do ducto pancreático (geralmente a partir da parede do duodeno através do esfíncter de Oddi), fechamento temporário da via biliar perto do hilo hepático, e perfusão retrógrada lenta de uma solução no ducto pancreático. A taxa de infusão é controlada por uma bomba que mantém a pressão constante evitando sua elevação durante o experimento (CHAN e LEUNG, 2007).

Este modelo induz deficiência em múltiplos órgãos tais como pulmões, rins, fígado, intestinos e cérebro e pode ser utilizado em coelhos, cães, porcos, ratos e camundongos (CHAN e LEUNG, 2007). Ocorre aumento nos níveis de amilase, lipase, citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6), ativação de tripsinogênio além de necrose e infiltrado inflamatório pancreático (LAUKKARINEN et al., 2007; MUILI et al., 2013). É um modelo tecnicamente difícil, apresentando significativas taxas de mortalidade nas primeiras 24 a 48 horas após a indução, quando utilizado altas concentrações de sal biliar (FOITZIK et al., 2000).

1.4. Fucoídina

O homem utiliza a natureza como fonte de medicamentos desde os tempos mais remotos. Os polissacarídeos naturais são, reconhecidamente, uma fonte de agentes modificadores da resposta biológica e têm atraído considerável atenção, sobretudo, dos pesquisadores da área de saúde devido às suas propriedades terapêuticas aliadas a uma baixa toxicidade (LEUNG *et al.*, 2006; SCHEPETKIN e QUINN, 2006). Diversos estudos de caracterização dos efeitos imunomoduladores, antitumorais, antimetastáticos, anticoagulantes, relação estrutura-atividade têm sido feitos com polissacarídeos sulfatados isolados de bactérias, fungos, plantas, algas e invertebrados marinhos (TZIANABOS, 2000; POMIN e MOURÃO, 2008; LEUNG *et al.*, 2006; VLIEGENTHART, 2006).

Fucoídina é um polissacarídeo sulfatado encontrado na matriz extracelular de algas marrons que apresenta diversas ações biológicas descritas na literatura, tais como: antitrombótica, anti-inflamatória, antiviral e antitumoral (RIOU *et al.*, 1996, BARRETO *et al.*, 2008; TOKITA *et al.*, 2010). Em humanos, muitos efeitos benéficos da fucoídina têm sido relatados, dentre eles, ação protetora contra úlcera gástrica, dispepsia funcional e atividade anticoagulante (IRHIMEH *et al.*, 2009).

Fucoídina também apresenta atividade inibitória de P e L selectinas. As selectinas possuem estrutura molecular comum, sendo seu sítio de ligação um domínio extracelular N-terminal do tipo lectina. Desta forma seus ligantes são as próprias constituintes desta família ou carboidratos expressos constitutivamente na membrana celular, como a mucina P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) e a fucana sulfatada fucoídina. A L-selectina é exclusivamente expressa na membrana de leucócitos e na vigência de um estímulo inflamatório, medeia o rolamento, ou seja, a captura inicial de neutrófilos à parede dos vasos (MCEVER *et al.*, 1995; HAFEZI-MOGHADAM, 2001; RAINER, 2002; PATEL *et al.*, 2002; SMALLEY e LEY, 2005; SMITH, 2008; LANGER e CHAVAKIS, 2009; CHAVAKIS *et al.*, 2009). A P-selectina é encontrada em plaquetas e estocada nos corpos de Weibel-Palade na célula endotelial. Na vigência de estimulação, a P-selectina é rapidamente mobilizada para a membrana celular, permitindo sua interação com leucócitos

circulantes (GENG et al., 1990). Dessa forma, a fucoidina inibe indiretamente o acúmulo de células (principalmente neutrófilos) no sítio inflamatório, por inibir as selectinas (TEIXEIRA e HELLEWELL, 1997). Neste contexto a fucoidina tem sido largamente utilizada na pesquisa biomédica como ferramenta farmacológica para estudos sobre a participação da migração de neutrófilos em diversos modelos experimentais (LEY et al., 1993; SOUZA et al., 2004; SOUZA et al., 2008; RUSSELL et al., 2009; PINTO et al., 2010).

Considerando a ausência de tratamento específico da pancreatite aguda devido à necessidade de maior compreensão de sua fisiopatologia, bem como o número limitado de informações acerca do papel das selectinas e da migração de neutrófilos na síndrome da resposta inflamatória sistêmica e disfunção múltipla de órgãos durante a pancreatite, no presente trabalho, visamos elucidar o efeito da inibição de P e L selectinas, pelo uso da fucoidina, sobre os parâmetros inflamatórios locais e sistêmicos e sobre as dismotilidades gastrintestinais durante a pancreatite aguda induzida experimental.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- ✓ Investigar o efeito da fucoidina sobre os parâmetros inflamatórios locais e sistêmicos e sobre as dismotilidades gastrintestinais em dois modelos experimentais de pancreatite aguda grave em camundongos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o efeito do tratamento com fucoidina sobre os parâmetros inflamatórios locais e sistêmicos, como níveis séricos de amilase, lipase, citocinas (IL-1 β e TNF- α), nitrito e malondialdeído pancreático na pancreatite aguda induzida por ceruleína ou por TLC-S;
- ✓ Testar a ação da fucoidina sobre os níveis de mieloperoxidase no pâncreas, pulmão e trato gastrintestinal na pancreática e pulmonar durante a pancreatite aguda induzida por ceruleína ou por TLC-S;
- ✓ Verificar, os efeitos da pancreatite aguda induzida por TLC-S sobre o esvaziamento gástrico, trânsito gastrintestinal e contratilidade de fundo de estômago e jejuno *in vitro* em camundongos;
- ✓ Investigar a ação da fucoidina sobre as alterações de motilidade gastrintestinal *in vivo* e *in vitro* na pancreatite aguda induzida por TLC-S, correlacionando com as alterações inflamatórias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

No presente trabalho foram usados camundongos Swiss, machos, com peso variando entre 20 e 30 g, procedentes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram colocados em caixas de plástico, forradas com raspa de madeira, num ambiente com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ com ciclo de 12h luz/12h escuro, recebendo água e ração ad libitum. Os grupos experimentais foram constituídos de 5-7 animais por grupo. Os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o projeto foi aprovado pelo Comitê a Comissão de Ética em Pesquisa animal (CEPA) da Faculdade de Medicina da UFC (Protocolo 26/2011).

3.2. Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais

- Material cirúrgico como pinças e tesouras
- Balança Analítica Ohaus AS2600
- Balança Analítica Marte AI200
- Béquers
- Centrífuga para Eppendorf Centrifuge 5804R
- Cânula para gavagem
- Espectrofotômetro Spectronic 20 genesys
- Freezer -20 e -70 graus
- Geladeira Consul
- Homogeinizador de tecidos
- Leitora de ELISA Biotec ELx 800
- Máquina fotográfica digital (Sony Cybershoot, 7,2 mpx)

- Material descartável para acondicionamento de material coletado como: eppendorfs e tubos de Falcon
- Medidor de pH Hanna Instruments HI 8519N
- Microscópio Leica acoplado a computador
- Micrótomo Olympus
- Placas para leitora de ELISA – 96 poços
- Pipetas Gilson automáticas de 1000, 200, 20, 10, 5, 1 μ L
- Pipeta multicanal – 12 poços
- Ponteiras para pipetas automáticas Sigma
- Seringas (B-D Plastipak)
- Vidraria: pipetas manuais e tubo de ensaio
- Vortex Maxi Mix II Thermolyne tipe 37600 mixer
- Tubos de polipropileno para centrífuga (15 e 50mL)

3.3. Drogas e Reagentes

- Ácido taurolitocólico 3-sulfato (Sigma, EUA)
- Ácido tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich, Brasil)
- Ácido Tricloacético (Sigma-Aldrich, Brasil)
- Brometo de hexadecilmetilamônio (Sigma, USA)
- Brometo de hexadeciltrimetilamônio (Sigma-Aldrich, Brasil)
- Ceruleína (Sigma, EUA)
- Ceruleína (Sigma, EUA)
- Diidrocloreto de N-1-(naftil)-etilenodiamina (Sigma-Aldrich, Brasil)
- diidrocloreto de o-dianisidine (Sigma, EUA)
- Eosina (Merck)
- Etanol absoluto (Vetec, Brasil)
- Fucoidina (Sigma, EUA)
- Hematoxilina (Reagen)
- Ketamina (Ketolar[®])
- Kit Elisa para determinação de IL-1 β (Quantikine[®], R&D Systems, USA)
- Kit Elisa para determinação de TNF-a (Quantikine[®], R&D Systems, USA)
- Kit para determinação de Amilase (Labtest, Brasil)

- Kit para determinação de lipase (Bioclin, Brasil)
- O-dianisidina (Sigma-Aldrich, Brasil)
- Peróxido de hidrogênio (Sigma, EUA)
- Peróxido de hidrogênio 30% (Vetec, Brasil)
- Sulfanilamida (Sigma-Aldrich, Brasil)
- Xilazina (Rompun[®])

3.4. Pancreatite Aguda Induzida por Ceruleína

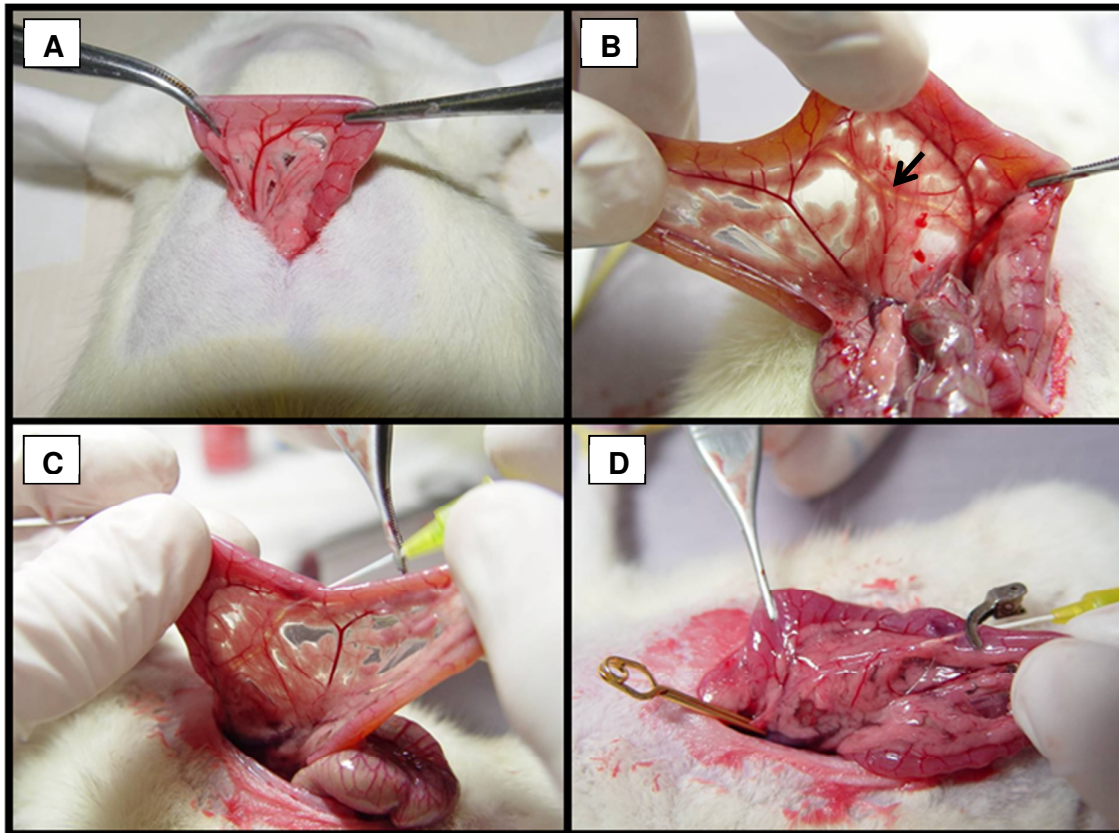
Para este modelo de pancreatite aguda os animais foram tratados 12 vezes, com intervalo de uma hora entre as administrações, por via intraperitoneal com ceruleína (50 µg/kg, suspensa em solução salina) (FROSSARD et al., 2002). Para avaliar o efeito da inibição das selectinas, um grupo de animais foi pré-tratado com solução salina (10 mL/kg, i.v.) ou fucoidina (25 mg/kg, i.v.) 30 minutos antes da primeira injeção e 30 minutos após a última injeção de ceruleína. Foi incluído também um grupo que recebeu somente solução salina (12X, 5 mL/Kg, i.p.). Após um período de 24 h da primeira injeção de ceruleína, os animais foram sacrificados e amostras de sangue, pâncreas, pulmão, estômago e jejuno foram colhidas e armazenadas em freezer a -70°C para posteriores análises. Amostras de pâncreas também foram retiradas e fixadas em formol a 10% para posterior processamento e análise histológica.

3.5. Pancreatite Aguda Induzida por Ácido Taurolitocólico (TLC-S)

Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.), e submetidos a uma laparotomia mediana, através da qual o ducto pancreático foi cuidadosamente cateterizado via transduodenal com um tubo de polietileno de 1 mm de diâmetro externo, de acordo com o método descrito por Perides (2010) (Figura 6). Em seguida, foram infundidos 50 µL de solução salina (0,9%) ou TLC-S (3%) sob um fluxo constante de 5 µL por minuto. A porção hepática do ducto foi previamente clampeada com uma pinça

hemostática, antes da infusão, para evitar o refluxo para o fígado (Figura 6 D). Fucoidina (25 mg/kg i.v.) foi administrada 30 min antes da indução da pancreatite. Foi incluído no estudo um grupo Sham que foi submetido somente ao procedimento cirúrgico, sem administração de drogas. Os animais foram sacrificados após 24 h da indução da pancreatite e amostras de sangue, pâncreas, pulmão, estômago e jejuno foram colhidas e armazenadas em freezer a -70°C para posteriores análises. Amostras de pâncreas também foram retiradas e fixadas em formol a 10% para posterior processamento e análise histológica.

Figura 6 – Procedimento cirúrgico para indução de pancreatite aguda por infusão retrógrada de TLC-S



A) Exposição do duodeno; B) Visualização do ducto bíliopancreático; C) Canulação do ducto bíliopancreático através do duodeno; D) Infusão retrógrada após clampagem do ducto bíliopancreático junto ao hilo hepático. Fonte: Modificado de Mossmann (2009).

3.6. Determinação de Amilase e Lipase Sérica

Após 24 horas da indução da pancreatite, amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados e centrifugados à 3000 g por 10 min à 4°C. Foi feita a determinação da amilase e lipase sérica por método colorimétrico usando o kit comercial para a determinação de amilase e kit comercial para a determinação de lipase, respectivamente. As análises foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante.

3.7. Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase (MPO) no Pâncreas, Pulmão, Estômago e Intestino

Esse experimento foi realizado utilizando de 20 a 50 mg de pâncreas, pulmão, estômago ou intestino por animal, de cada grupo. A MPO é uma enzima encontrada predominantemente em grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares e tem sido usado como índice quantitativo para avaliar a inflamação em vários tecidos. Para tanto, as amostras foram suspensas em tampão de hexadeciltrimetilamônio (pH 6,0; 50mg de tecido por mL de tampão) e depois trituradas com um homogeneizador de tecidos. As amostras foram congeladas, descongeladas e trituradas três vezes. Posteriormente foram centrifugadas a 4500 rpm, durante 12 min a uma temperatura de 4°C; o sobrenadante foi, então, colhido. Os níveis teciduais da atividade de MPO foram determinados por meio da técnica descrita por Bradley e cols (1982), utilizando peróxido de hidrogênio 0,0005 % como substrato para MPO. 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 25°C. No ensaio, a medida que o peróxido de hidrogênio é degradado ocorre a produção de ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianisidina em composto de cor marrom. A variação da densidade óptica da mistura das amostras com a solução de o-dianisidina em função do tempo de reação foi medida por espectrofotômetro a 450 nm. Os resultados foram expressos como unidade de MPO/mg de tecido.

3.8. Avaliação Histopatológica do Pâncreas

Para a avaliação histopatológica, Amostras da cabeça do pâncreas foram retiradas e fixadas em formaldeído 10%, onde permaneceu por 24 horas. Em seguida as amostras foram transferidas para uma solução de álcool 70%, onde permaneceu até a realização dos procedimentos histológicos. Inicialmente, as amostras foram seccionadas e embebidas em parafina. Secções de 5 micrometros foram removidas da parafina, colocadas numa lâmina e coradas com hematoxilina-eosina e em seguida examinadas através de um microscópio óptico. As alterações morfológicas características de pancreatite avaliadas foram edema, infiltração inflamatória e necrose acinar, com escores variando de 0 a 3 segundo Wildi e cols (2007), sendo 9 o escore máximo. Toda a avaliação histopatológica foi realizada através de um estudo cego por um histopatologista experiente.

3.9. Dosagem de Citocinas Séricas (TNF- α e IL-1- β)

Amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados, centrifugadas à 3000g por 10 min à 4°C e estocadas a -70°C até a realização das dosagens pelo método de ELISA (CUNHA *et al*, 1993), utilizando o protocolo descrito a seguir: 1) Centrifugação a 3000rpm a 4°C por 10 min e retirada do sobrenadante; 2) Incubação com 2 μ g/mL de anticorpo (anticorpo de captura) diluído em tampão de bicarbonato (pH 8,2) – 100 μ L/poço (placa de 96 poços) por 16-24 h a 4°C; 3) Lavagem da placa (3x) com PBS-tween 20, 0,1% v/v; 4) Bloqueio com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100 μ L/poço por 2h à temperatura ambiente; 5) Lavagem da placa (3x); 6) Incubação com a curva padrão das citocinas diluídas em tampão de lavagem e das amostras a serem dosadas (100 μ g/poço por 16-24 h à 4°C); 7) Lavagem da placa (3x); 8) Incubação com anticorpo biotilnado diluído a 1:1000 em tampão de lavagem contendo 1% de soro normal de carneiro por 1h à temperatura ambiente; 9) Lavagem da placa (3x); 10) Incubação com avidina-peroxidase (DAKO) diluída 1:5000 em tampão de lavagem, 100 μ L/poço por 15 min à temperatura ambiente; 11) Lavagem da placa (3x); 12) Incubação com o-fenilenediamina (OPD) em tampão substrato, 100 μ L/poço, cobrir a placa e deixar no escuro por 5-20 min à

temperatura ambiente; 13) A reação foi parada com 150µL/poço de H₂SO₄ 1M; 14) A intensidade da coloração foi medida em espectrofotômetro a 490 nm; 15) Os resultados foram expressos como média ± E.P.M da quantidade de TNF-α ou IL-1-β em pg/mL, para 4-6 amostras por tratamento.

3.10. Determinação dos Níveis de Nitrito Sérico

A dosagem de nitrito foi obtida como um indicador da produção de óxido nítrico, através da determinação do conteúdo total de nitrito/nitrato (NO₂⁻ / NO₃⁻) em amostras de plasma, determinado espectrofotometricamente pela reação de Griess (CHEN *et al.*, 2000). Inicialmente, amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados e centrifugados à 3000g por 10 min à 4°C. Para o ensaio, 20 µl de plasma foram incubados por 12 horas com 40 µl de tampão contendo a enzima nitrato redutase em placas de 96 poços. A seguir, foram adicionados 80 µL da solução de Griess (2% de sufamilamida, ácido fosfórico 5%, NEED e água destilada) em cada poço. A coloração púrpura/magenta aparece imediatamente e é medida em leitor de placas com filtro de 540 nm. A curva-padrão foi obtida a partir de uma série de diluições de NO₂⁻ (640 µM, 320 µM, 160 µM, 80 µM, 40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM e 0,625 µM). Os valores obtidos para as amostras experimentais foram comparados com os obtidos para curva padrão.

3.11. Determinação da Concentração Pancreática de Malondialdeído

Essa técnica foi descrita por Ohkawa e cols (1979). Baseia-se na medida dos níveis de malondialdeído (MDA), produto final da peroxidação lipídica, o qual reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando o complexo de coloração rosa (cromóforo) que pode ser quantificado em espectrofotômetro. O complexo formado por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é amplamente usado como biomarcador de peroxidação lipídica em sistemas biológicos. Amostras do pâncreas dos animais foram retiradas, pesadas e homogeneizadas com KCl 0,15 M (relação 1:10). Foram adicionados a 500 µL desse homogenato 200 µL de duodecil sulfato de

sódio 8,1% e 1,5 mL de ácido acético 20%, o pH da solução foi ajustado para 3,5. Foram adicionados ainda 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (0,8% p/v) e quantidade de água destilada suficiente para completar volume final de 4 mL. Todas as amostras foram colocadas em banho-maria, a 95° C, durante 1 h. Após resfriamento da amostra, foi adicionado 1 mL de água destilada e 5 mL de n-butanol. Os conteúdos foram misturados por 1min com um misturador "vortex", centrifugados a 1200 x g por 10 minutos e a absorbância da camada orgânica mensurada em 520 e 535 nm. Os resultados foram expressos em mmol/g de fragmentos umedecidos.

3.12. Determinação do Esvaziamento Gástrico e do Trânsito Gastrintestinal

Após 24 h da indução da pancreatite aguda por TLC-S, foi avaliado o esvaziamento gástrico, trânsito intestinal e centro geométrico da refeição conforme técnica descrita por Miller, 1981. Após 18 h de jejum, os animais receberam por gavagem 350 µL da refeição teste, que consiste de um marcador não absorvível (0,75 mg/mL de vermelho de fenol em solução glicosada a 5%). Decorridos 20 min, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Após a laparotomia, o estômago e o intestino delgado foram expostos e rapidamente isolados, por ligaduras nas junções esôfago-gástrica, gastro-duodenal e ileo-cecal, e removidos. Após a retirada, o estômago e três porções do intestino (proximal, medial e distal) foram colocados em uma mesa e divididos em tamanhos aproximadamente iguais. Cada um destes segmentos foi introduzido num cilindro graduado e o volume total foi aferido através da adição de 10 mL de NaOH 0,1 M. A seguir, os segmentos foram cortados e homogeneizados por 30 s. Após 20 minutos da homogeneização, 1 mL do sobrenadante foi centrifugado por 10 min à 2800 rpm. As proteínas do homogeneizado foram precipitadas através da adição de 50 µL de ácido tricloroacético (20%), e novamente centrifugadas por 20 min a 2800 rpm. A seguir, 150 µL do sobrenadante foram adicionados a 200 µL de NaOH 0,5 M. A absorbância das amostras foi estabelecida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm e expresso em densidade óptica (D.O.). A curva padrão foi obtida da medida por espectrofotômetro à 540 nm de uma concentração conhecida de vermelho de fenol diluída em NaOH 0,1 M. Após a determinação do coeficiente linear da curva

padrão, a concentração da solução (C=D.O.) e a quantidade de vermelho de fenol (m) por cada segmento ($m = C \times \text{volume}$) foram determinados. A retenção gástrica (x) foi expressa pela % de acordo com a seguinte equação: Retenção gástrica de corante x = (quantidade de vermelho de fenol recuperada do estômago/quantidade total de vermelho de fenol recuperada nos segmentos do TGI). O trânsito intestinal foi expresso pela %, de acordo com a seguinte fórmula: Retenção de corante em cada segmento intestinal/ quantidade total de vermelho de fenol recuperada em todos os três segmentos intestinais (proximal, medial e distal). O trânsito gastrintestinal da refeição foi estimado de acordo com o método do centro geométrico (Miller et.al., 1981). De acordo com este princípio, obtivemos o produto da retenção fracional de cada segmento (estômago - 1, intestino proximal - 2, intestino medial - 3 e intestino distal - 4). A somatória desses valores indica o centro geométrico da refeição propelida ao longo do intestino.

3.13. Avaliação da Contratilidade de Fundo de Estômago e Jejuno *in vitro*

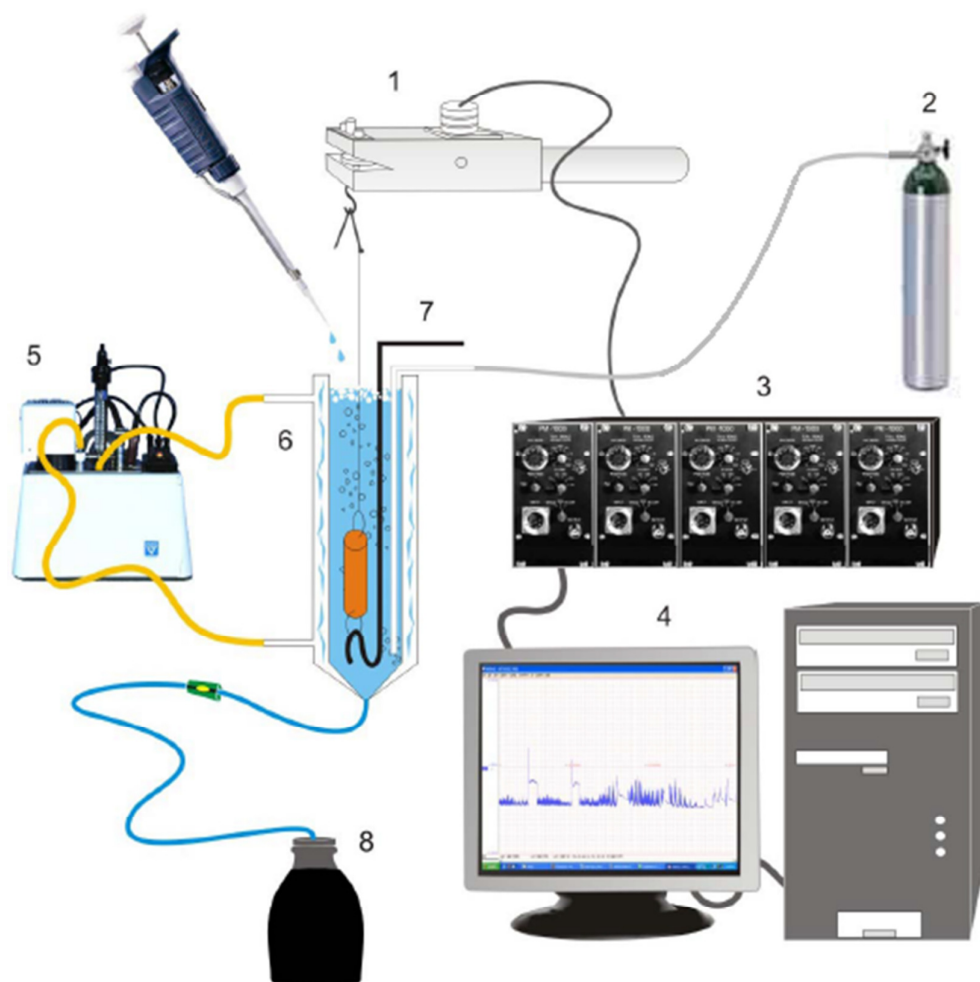
Foram realizados os estudos da contratilidade *in vitro* de fundo de estômago e jejuno no modelo de pancreatite aguda induzida por TLC-S, 24 horas após a indução da pancreatite. Após exposição da cavidade peritoneal dos animais, segmentos de fundo gástrico e jejuno (0,5-1,0 cm) foram retirados e colocados em uma placa de Petri, contendo uma solução nutriente de Tyrode Normal (pH= 7.4), composição (mmol/L): 128 NaCl, 4,5 KCl, 2,5 CaCl₂, 1,18 MgSO₄, 1,18 KH₂PO₄, 125 NaHCO₃ e 5,55 glicose. Em seguida, os segmentos foram montados em câmaras orgânicas com volume de 5 mL, com solução Tyrode, à temperatura de 37°C, pH= 7.4, oxigenadas com mistura de 5% de CO₂ e 95% de O₂ (AUBÉ *et al.*,1996). Uma das extremidades dos segmentos foi presa à base fixa e a outra a um transdutor de força isométrico (modelo Panlab S.L, Barcelona, Espanha) (**Figura 7**). Foram aplicadas aos tecidos uma tensão de 1 g por um período de equilíbrio de 60 minutos, com troca de líquido nutriente a cada 15 min. Para avaliar a responsividade do tecido, duas contrações padrão foram inicialmente obtidas mediante a adição de KCl 60 mM ao banho e, em seguida, foi feita uma curva de carbacol (0,01 µM – 30 µM) e outra de estímulo elétrico (2.0, 4.0 e 8.0 Hz; 1 ms; 40 V, durante 10 s, com 10 min de intervalo). Os dados obtidos foram analisados como percentual de resposta contrátil

em relação à média das contrações padrão observadas inicialmente para o KCl 60 mM.

3.14. Análise Estatística

Os dados paramétricos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada análise de variância (ANOVA) e teste de Student Newman Keul. Os dados não paramétricos foram reportados como medianas e aplicados os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney, seguido de Dunn. Para todas as análises foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Figura 7 – Esquema simplificado dos equipamentos utilizados nos experimentos de contratilidade *in vitro*



1) Transdutor de força; 2) Carbogênio (5% de CO₂ e 95% de O₂); 3) Amplificador; 4) Computador com sistema de aquisição de dados (Chart Pro, EUA); 5) Banho de circulação mantido a 37°C; 6) Cuba de 5 mL; 7) Haste fixa; 8) Coletor. Fonte: Modificado de Jucá, D.M. (2007).

4. RESULTADOS

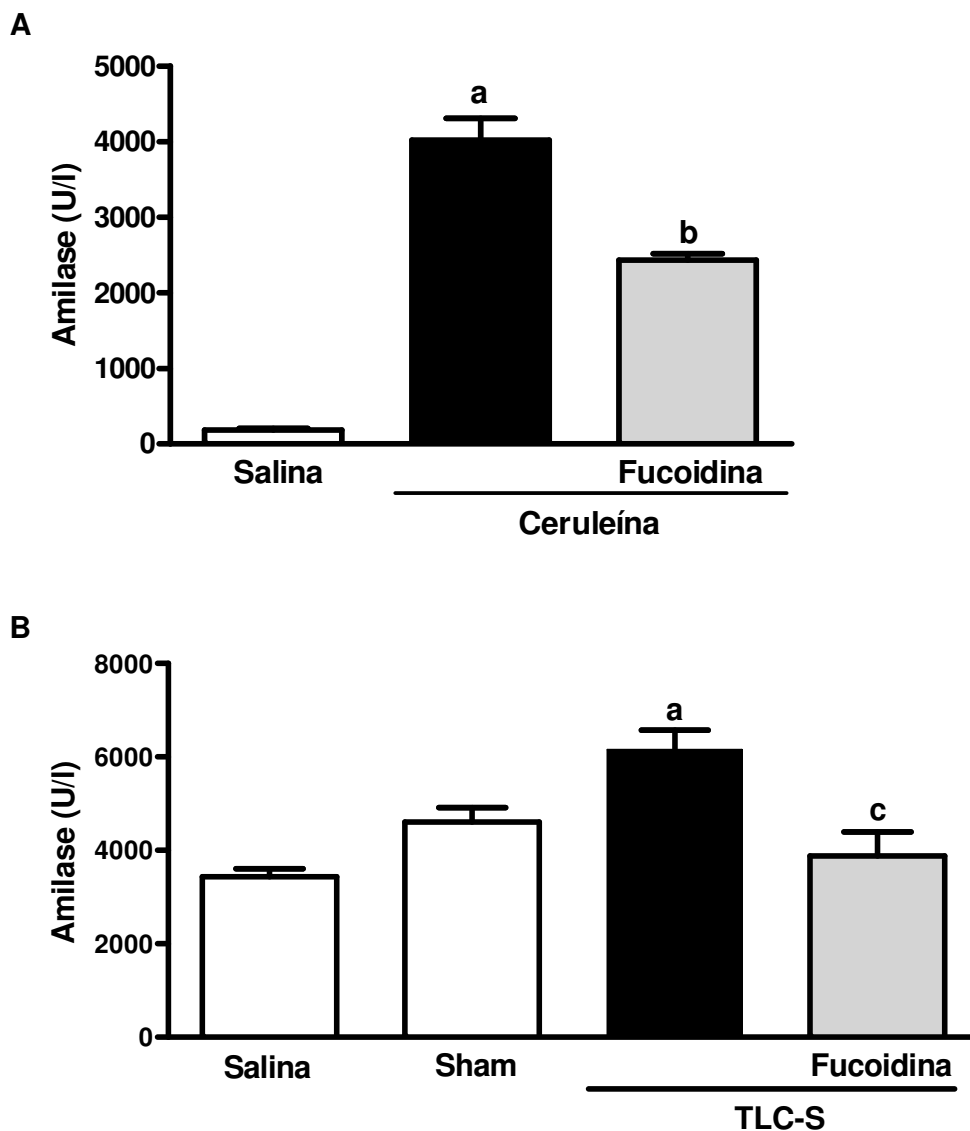
4.1. Efeito da Fucoidina Sobre os Níveis Séricos de Amilase e Lipase na Pancreatite Aguda

Os níveis séricos de amilase e lipase foram aumentados na pancreatite aguda induzida por ceruleína e por TLC-S, em relação aos grupos controle Salina e Sham. No modelo de pancreatite aguda induzida por ceruleína, o tratamento com fucoidina reduziu significativamente os níveis de amilase e lipase em 39% e 37%, respectivamente (**Figura 8A, Figura 9A**). Fucoidina também reduziu os níveis de amilase em 91%, e os de lipase em 92%, na pancreatite aguda induzida por TLC-S (**Figura 8B, Figura 9B**).

4.2. Efeito da Fucoidina Sobre a Atividade de MPO Pancreática e Pulmonar na Pancreatite Aguda

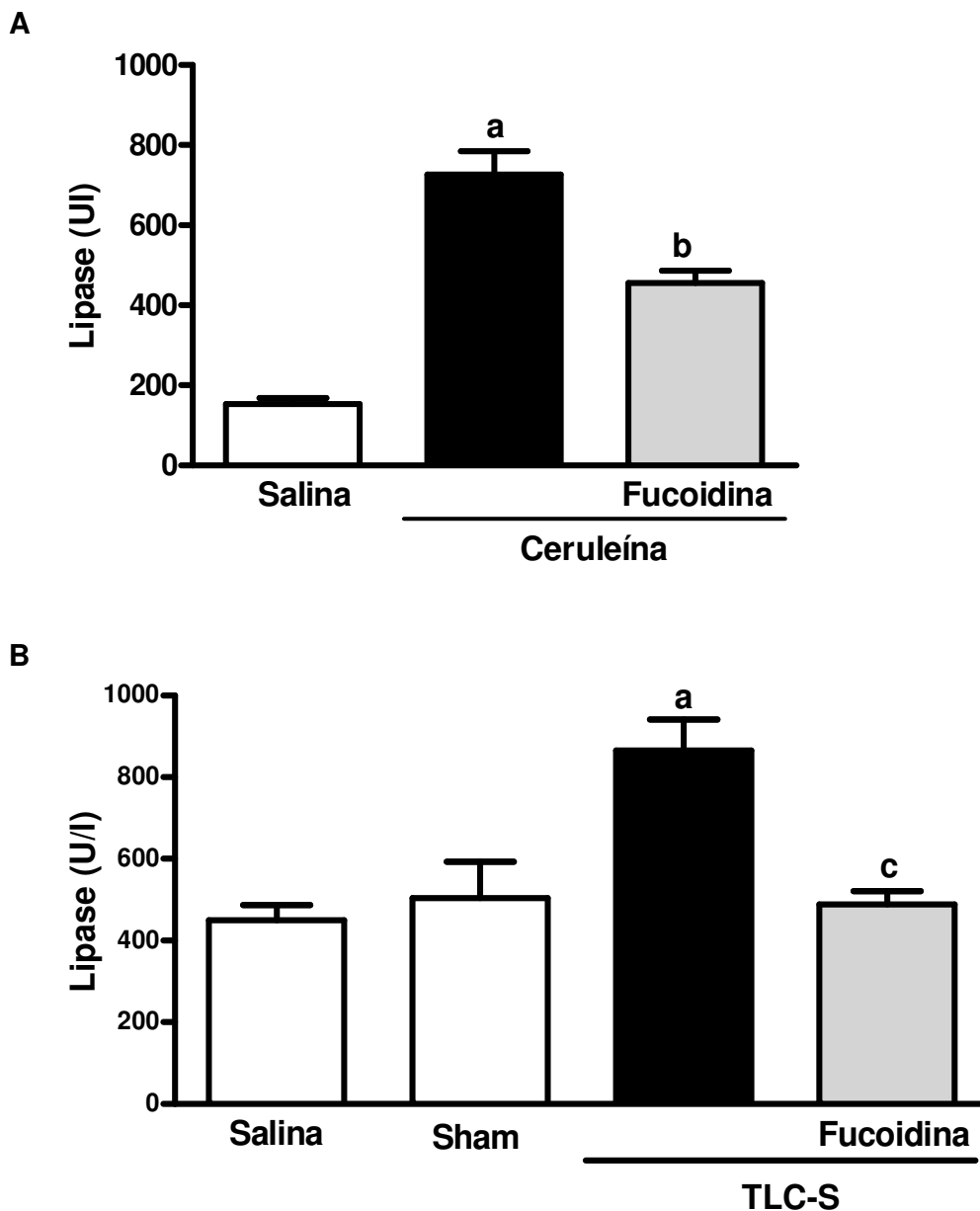
Em ambos os modelos de pancreatite aguda foi observado um aumento na atividade de MPO pancreática em comparação com os grupos controle (**Figura 10**). Fucoidina reduziu de forma significativa a atividade de MPO no pâncreas em 92% no modelo ceruleína (**Figura 10A**), e em 93% no modelo TLC-S (**Figura 10B**). A atividade de MPO pulmonar foi aumentada nos animais de ambos os modelos de pancreatite aguda (**Figura 11**). Fucoidina também reduziu significativamente o aumento na atividade de MPO pulmonar em 98% e 99%, nos modelos ceruleína (**Figura 11A**) e TLC-S (**Figura 11B**), respectivamente.

Figura 8 - Efeito da fucoidina sobre os níveis de amilase sérica na pancreatite aguda



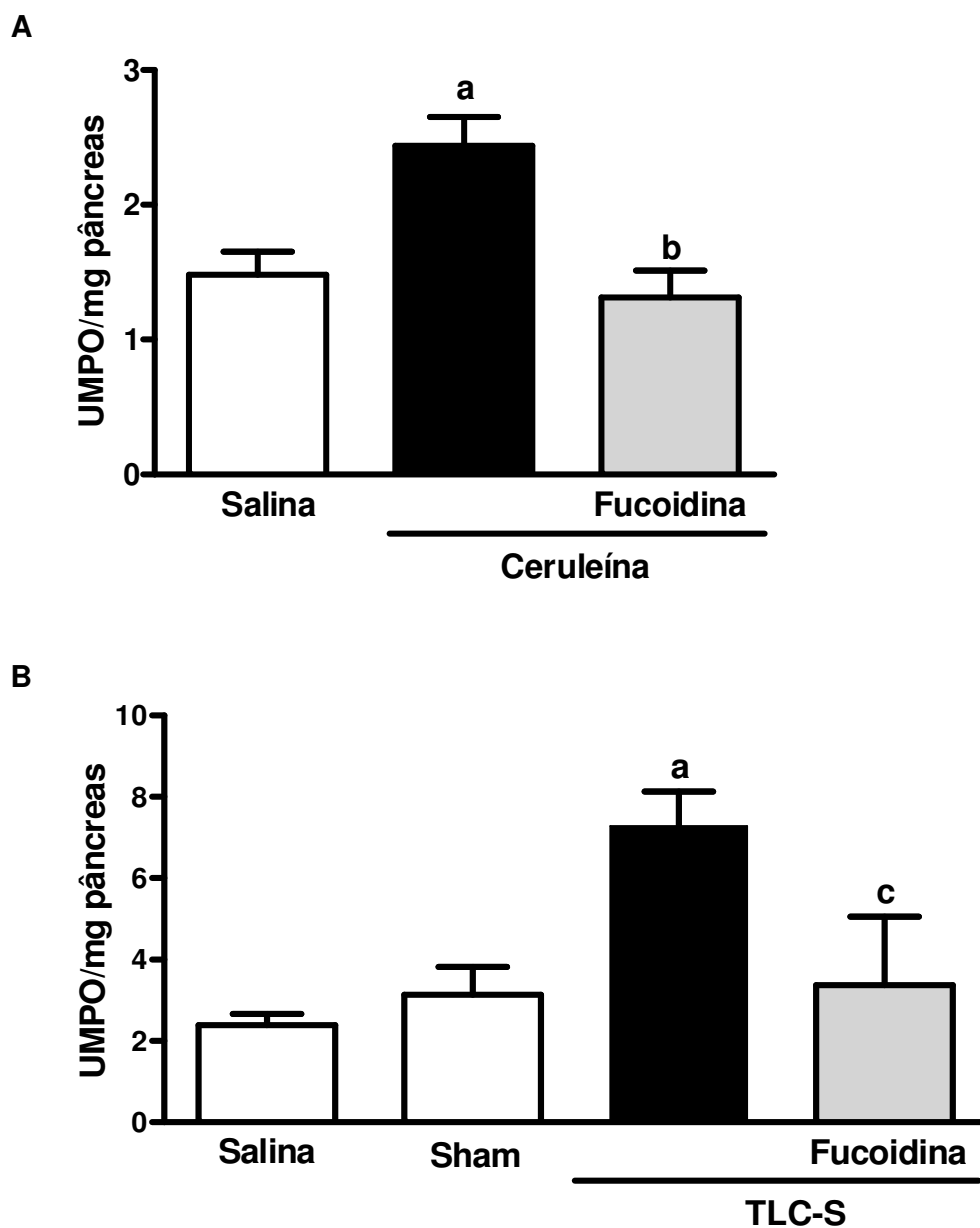
O tratamento com fucoidina impediu o aumento dos níveis séricos de amilase durante a pancreatite aguda induzida por ceruleína (50 µg/kg i.p., a cada hora, durante 12 horas, painel A) ou por TLCS (3%, 50 µl, infusão retrógrada no ducto bileo-pancreático, painel B). No modelo ceruleína os animais receberam fucoidina (25 mg/kg, iv) 30 min antes da primeira e imediatamente após a última injeção de ceruleína. No modelo TLC-S, fucoidina foi administrada (25 mg/kg, iv) 30 min antes da indução da pancreatite. O grupo controle recebeu somente solução salina. Após 24 horas, amilase foi medida no soro. Cada coluna representa a média ± E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo. a $p < 0,05$ vs grupo Salina e/ou Sham; b $p < 0,05$ vs grupo Ceruleína; c $p < 0,05$ versus TLC-S grupo; ANOVA e teste Newman-Keuls.

Figura 9 - Efeito da fucoidina sobre os níveis de lipase sérica na pancreatite aguda



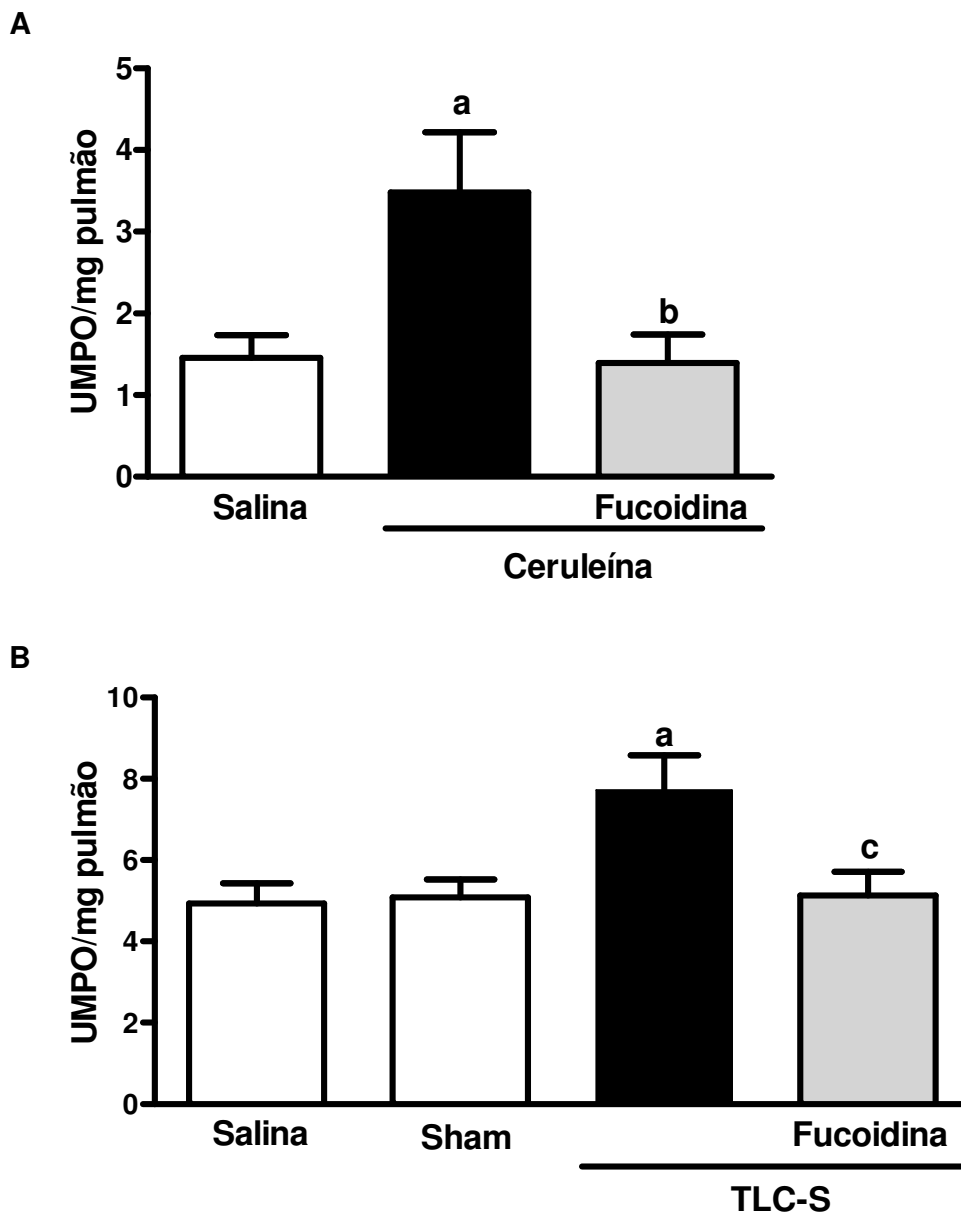
O tratamento com fucoidina impediu o aumento dos níveis séricos de lipase durante a pancreatite aguda induzida por ceruleína (50 µg/kg i.p., a cada hora, durante 12 horas, painel A) ou por TLCS (3%, 50 µl, infusão retrógrada no ducto bileo-pancreático, painel B). No modelo ceruleína os animais receberam fucoidina (25 mg/kg, iv) 30 min antes da primeira e imediatamente após a última injeção de ceruleína. No modelo TLC-S, fucoidina foi administrada (25 mg/kg, iv) 30 min antes da indução da pancreatite. O grupo controle recebeu somente solução salina. Após 24 horas, lipase foi medida no soro. Cada coluna representa a média ± E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo. a $p < 0,05$ vs grupo Salina e/ou Sham; b $p < 0,05$ vs grupo Ceruleína; c $p < 0,05$ versus TLC-S grupo; ANOVA e teste Newman-Keuls.

Figura 10 - Efeito da fucoidina sobre a atividade de MPO pancreática na pancreatite aguda



O tratamento com fucoidina impediu o aumento da atividade de MPO pancreática durante a pancreatite aguda induzida por ceruleína (50 µg/kg i.p., a cada hora, durante 12 horas, painel A) ou por TLC-S (3%, 50 µl, infusão retrógrada no ducto bileo-pancreático, painel B). No modelo ceruleína os animais receberam fucoidina (25 mg/kg, iv) 30 min antes da primeira e imediatamente após a última injeção de ceruleína. No modelo TLC-S, fucoidina foi administrada (25 mg/kg, iv) 30 min antes da indução da pancreatite. O grupo controle recebeu somente solução salina. Após 24 horas, a atividade de MPO foi medida em amostras de pâncreas. Cada coluna representa a média ± E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo. a $p < 0,05$ vs grupo Salina e/ou Sham; b $p < 0,05$ vs grupo Ceruleína; c $p < 0,05$ versus TLC-S grupo; ANOVA e teste Newman-Keuls.

Figura 11 - Efeito da fucoidina sobre a atividade de MPO pulmonar na pancreatite aguda

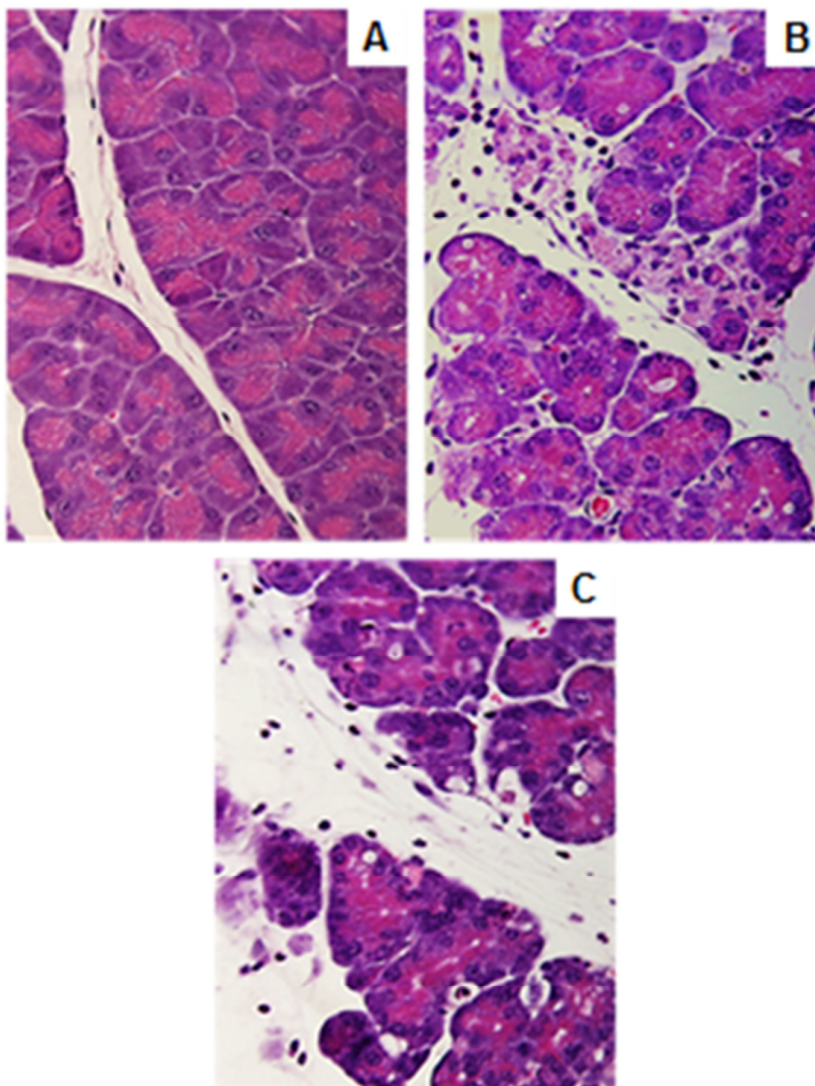


O tratamento com fucoidina impediu o aumento da atividade de MPO pulmonar durante a pancreatite aguda induzida por ceruleína (50 µg/kg i.p., a cada hora, durante 12 horas, painel A) ou por TLC-S (3%, 50 µl, infusão retrógrada no ducto bileo-pancreático, painel B). No modelo ceruleína os animais receberam fucoidina (25 mg/kg, iv) 30 min antes da primeira e imediatamente após a última injeção de ceruleína. No modelo TLC-S, fucoidina foi administrada (25 mg/kg, iv) 30 min antes da indução da pancreatite. O grupo controle recebeu somente solução salina. Após 24 horas, a atividade de MPO foi medida em amostras de pulmão. Cada coluna representa a média ± E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo. a $p < 0,05$ vs grupo Salina e/ou Sham; b $p < 0,05$ vs grupo Ceruleína; c $p < 0,05$ versus TLC-S grupo; ANOVA e teste Newman-Keuls.

4.3. Efeito da Fucoidina Sobre os Danos Histológicos Pancreáticos na Pancreatite Aguda

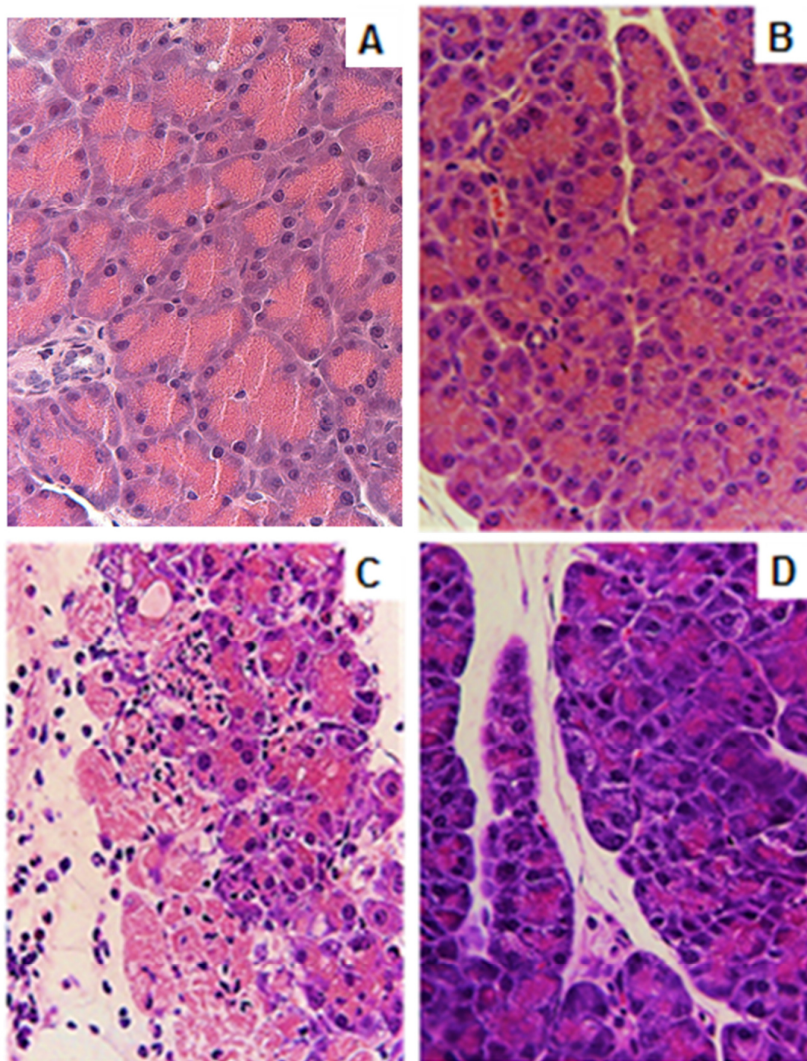
O exame histológico dos grupos controle, salina e sham, de ambos os modelos, mostrou arquitetura normal e ausência de lesões no pâncreas (**Figura 12A, Figura 13A e B**). Já a análise das secções pancreáticas dos grupos tratados com ceruleína ou TLC-S revelou extenso dano tecidual, caracterizado por edema, infiltrado de células inflamatórias e necrose de células acinares (**Figura 12B, Figura 13C**). O tratamento com fucoidina reduziu de forma significativa o dano ao tecido pancreático em ambos os modelos (**Figura 12C, Figura 13D**). No entanto, enquanto fucoidina reduziu significativamente cada parâmetro individual (edema, infiltrado de células inflamatórias e necrose de células acinares) no modelo TLCS, a sua ação protetora no modelo ceruleína só foi significativa na contagem total de escores (**Tabela 2**).

Figura 12 - Efeito da fucoidina sobre os danos histológicos pancreáticos na pancreatite aguda induzida por ceruleína



(A) Pâncreas de grupo de controle, (B) Pâncreas de animais com pancreatite aguda induzida por ceruleína, mostrando um dano extensivo do tecido pancreático, (C) Pâncreas de animais com pancreatite aguda induzida por ceruleína tratados com fucoidina, mostrando preservação do tecido. Para indução da pancreatite os animais receberam ceruleína (50 µg/kg i.p., a cada hora, durante 12 horas). O tratamento com fucoidina (25 mg/kg, i.v.) foi realizado 30 min antes da primeira e imediatamente após a última injeção de ceruleína. O grupo controle recebeu somente solução salina. O pâncreas foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (400x).

Figura 13 - Efeito da fucoidina sobre os danos histológicos pancreáticos na pancreatite aguda induzida por TLC-S



(A) Pâncreas de grupo de controle (B), Pâncreas do grupo Sham, (C) Pâncreas de animais com pancreatite aguda induzida por TLC-S, mostrando ruptura extensa da arquitetura do pâncreas com edema, necrose acinar e infiltração de células inflamatórias, (D) Pâncreas de animais com pancreatite aguda induzida por TLC-S tratados com fucoidina, mostrando preservação do tecido. Para indução da pancreatite os animais receberam TLC-S (3%, 50 μ l, infusão retrógrada no ducto bileo-pancreático). Fucoidina foi administrada (25 mg/kg, i.v.) 30 min antes da indução da pancreatite. O grupo controle recebeu somente solução salina. O pâncreas foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (400x).

Tabela 2 - Efeito da fucoidina sobre os danos histológicos pancreáticos na pancreatite aguda

Modelo	Tratamento	Edema (0-3)	Infiltrado inflamatório (0-3)	Necrose Acinar (0-3)	Escores Totais (0-9)
Ceruleína	Salina	1 (1-1)	1 (1-1)	1.5 (1-2)	3.5 (3-4)
	Ceruleína	3 (3-3) ^a	3 (3-3) ^a	2.5 (2-3) ^a	8.5 (8-9) ^a
	Ceruleína + Fucoidina	2 (2-3)	3 (2-3)	2 (2-3)	7 (6-8) ^b
TLC-S	Salina	2 (1-3)	1 (0-3)	2 (0-3)	5 (2-6)
	Sham	2 (1-3)	1.5 (1-3)	1.5 (1-3)	4.5 (3-7)
	TLC-S	3 (2-3) ^a	2.5 (1-3) ^a	2.5 (2-3) ^a	8 (5-9) ^a
	TLC-S + Fucoidina	1 (1-2) ^c	1 (1-1) ^c	2 (1-2) ^c	4 (3-5) ^c

Os valores representam a mediana com mínimo e máximo, respectivamente, dos valores de 6 animais por grupo. a p<0,05 vs grupo Salina e/ou Sham; b p<0,05 vs grupo Ceruleína; c p<0,05 versus TLC-S grupo (ANOVA e teste Kruskal-Wallis).

4.4. Efeito da Fucoídina Sobre os Níveis Séricos de TNF- α e IL-1 β na Pancreatite Aguda

Os níveis séricos das citocinas TNF- α e IL-1 β foram significativamente aumentados em ambos os modelos de pancreatite aguda em relação aos grupos controle. No modelo ceruleína, o tratamento com fucoídina reduziu os níveis de TNF- α e IL-1 β em 97% e 83%, respectivamente. Já no modelo TLC-S, os animais tratados com fucoídina apresentaram uma redução de 79% nos níveis de TNF- α , e de 86% nos níveis de IL-1 β (**Tabela 3**).

4.5. Efeito da Fucoídina Sobre os Níveis Séricos de Nitrito/Nitrato na Pancreatite Aguda

Ambos os modelos de pancreatite aguda induziram um aumento nos níveis séricos de nitrito/nitrato. O tratamento com fucoídina reduziu de maneira significativa, os níveis de nitrato/nitrito no plasma dos animais tratados com ceruleína ou TLC-S em 60% e 52%, respectivamente (**Tabela 3**).

4.6. Efeito da Fucoídina Sobre os Níveis de MDA Pancreático na Pancreatite Aguda

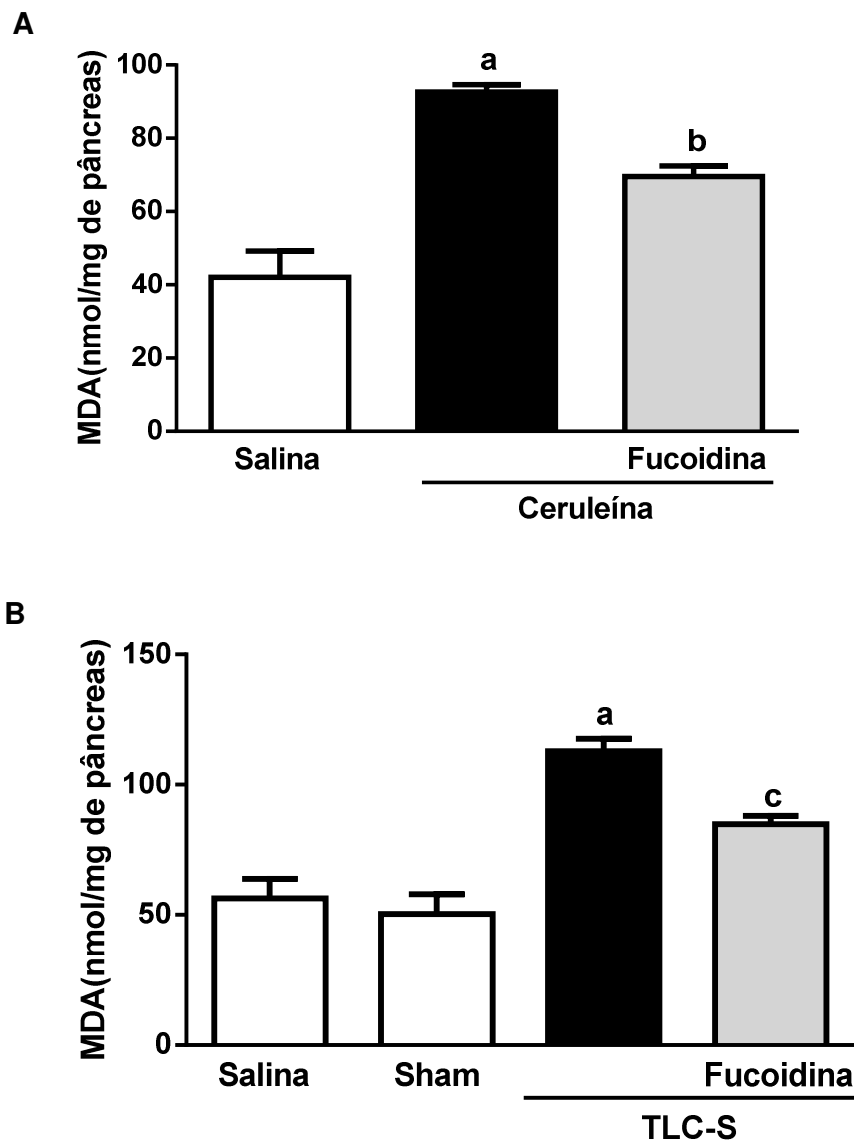
Os níveis pancreáticos de MDA foram aumentados em ambos os modelos de pancreatite aguda, em comparação aos grupos controle. Fucoídina reduziu significativamente o aumento dos níveis de MDA, sendo esta redução de 39% no modelo ceruleína, e 43% no modelo TLC-S (**Figura 14**).

Tabela 3 - Efeito da fucoidina sobre os níveis de TNF- α , IL-1 β e nitrito na pancreatite aguda

Modelo	Tratamento	TNF-α (pg/ml)	IL-1β (pg/ml)	Nitrito (μM)
Ceruleína	Salina	68,27 \pm 9,40	12,8 \pm 5,55	2,38 \pm 0,91
	Ceruleína	93,50 \pm 1,56 ^a	28,89 \pm 3,95 ^a	17,06 \pm 1,70 ^a
	Ceruleína + Fucoidina	70,81 \pm 3,48 ^b	15,07 \pm 8,60 ^b	6,85 \pm 1,49 ^b
TLC-S	Salina	80,96 \pm 36,36	111,9 \pm 3,10	7,81 \pm 2,36
	Sham	28,91 \pm 9,76	121,1 \pm 3,95	12,52 \pm 2,67
	TLC-S	206,9 \pm 47,01 ^a	168,2 \pm 8,60 ^a	46,18 \pm 8,64 ^a
	TLC-S + Fucoidina	42,96 \pm 17,67 ^c	139,1 \pm 3,10 ^c	22,16 \pm 2,97 ^c

Os valores representam a média \pm E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo. a $p < 0,05$ vs grupo Salina e/ou Sham; b $p < 0,05$ vs grupo Ceruleína; c $p < 0,05$ versus TLC-S grupo; ANOVA e teste Newman-Keuls.

Figura 14 - Efeito da fucoidina sobre os níveis de MDA pancreático na pancreatite aguda



O tratamento com fucoidina impediu o aumento dos níveis de MDA pancreático durante a pancreatite aguda por ceruleína (50 µg/kg i.p., a cada hora, durante 12 horas, painel A) ou por TLC-S (3%, 50 µl, infusão retrógrada no ducto bileo-pancreático, painel B). No modelo ceruleína os animais receberam fucoidina (25 mg/kg, iv) 30 min antes da primeira e imediatamente após a última injeção de ceruleína. No modelo TLC-S, fucoidina foi administrada (25 mg/kg, iv) 30 min antes da indução da pancreatite. O grupo controle recebeu somente solução salina. Após 24 horas, os níveis de MDA foram medidos em amostras de pâncreas. Cada coluna representa a média ± E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo. a p<0,05 vs grupo Salina e/ou Sham; b p<0,05 vs grupo Ceruleína; c p<0,05 versus TLC-S grupo; ANOVA e teste Newman-Keuls.

4.7. Alterações de Motilidade e Atividade de MPO no Trato Gastrointestinal na Pancreatite Aguda Induzida Por TLC-S

4.7.1. Efeito da Fucoidina Sobre o Retarde no Esvaziamento Gástrico de Líquidos na Pancreatite Aguda Induzida por TLC-S

Na Figura 15, observa-se que na pancreatite aguda induzida por TLC-S, no tempo 20 minutos após a refeição, os animais tratados com TLC-S apresentaram retarde significativo no esvaziamento gástrico, quando comparado aos grupos controle.

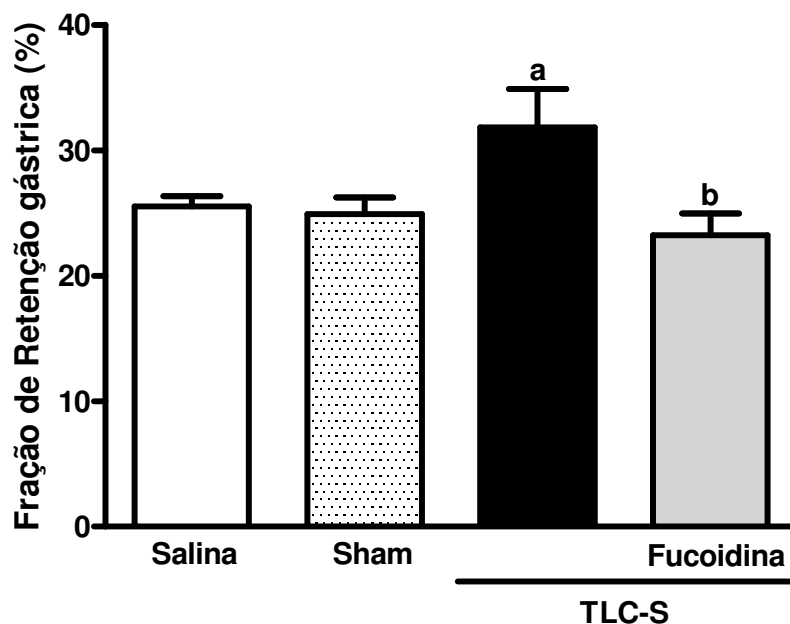
Os animais tratados com fucoidina tiveram o retardo no esvaziamento gástrico promovido pelo TLC-S revertido, apresentando níveis de retenção gástrica semelhante aos grupos controle (**Figura 15**).

4.7.2. Efeito da Fucoidina Sobre o Retarde no Trânsito Intestinal na Pancreatite Aguda Induzida por TLC-S

Na Figura 16, observamos que o trânsito intestinal nos animais com pancreatite aguda induzida por TLC-S apresentou uma maior retenção no segmento proximal do intestino após 20 minutos da refeição, em relação aos grupos controle. No segmento distal, a retenção de corante mostrou-se semelhante entre todos os grupos.

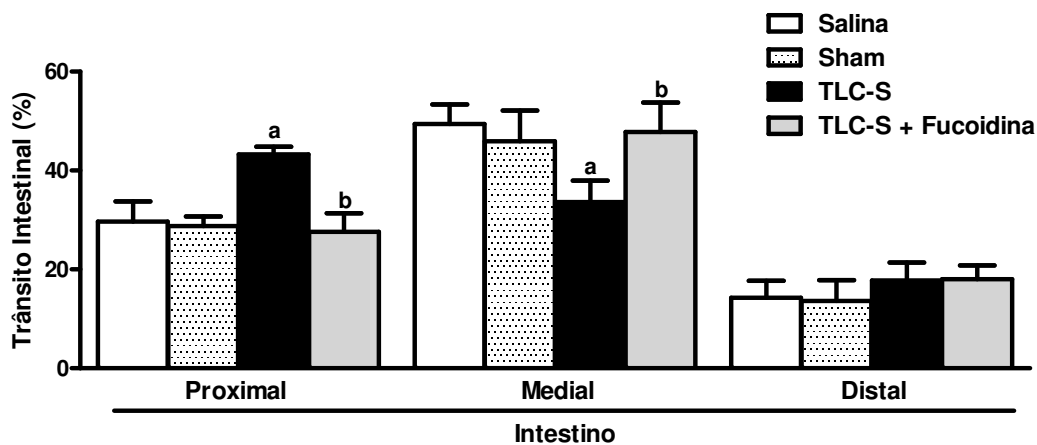
O tratamento com fucoidina foi capaz de reverter o retardo no trânsito intestinal promovido pela pancreatite aguda induzida por TLC-S. No segmento distal, não houve alteração na retenção de corante entre todos os grupos (**Figura 16**).

Figura 15 - Efeito da fucoïdina no retardo do esvaziamento gástrico de líquidos na pancreatite aguda induzida por TLC-S



Fucoïdina foi administrada (25 mg/kg, iv) 30 min antes da indução da pancreatite por TLC-S (3%, 50 μ l, infusão retrógrada no ducto bileo-pancreático). O grupo controle recebeu somente soluço salina. Após jejum de 18 h os animais receberam por gavagem 350 μ l da refeio padrão. Decorridos 20 minutos após a administrao do marcador os animais foram sacrificados e o esvaziamento gástrico foi avaliado por espectrofotometria. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo. a $p < 0,05$ vs grupo Salina e Sham; b $p < 0,05$ vs grupo TLC-S; ANOVA e teste Newman-Keuls.

Figura 16 - Efeito da fucoidina sobre o retardo do trânsito intestinal na pancreatite aguda induzida por TLC-S



Fucoidina foi administrada (25 mg/kg, iv) 30 min antes da indução da pancreatite por TLC-S (3%, 50 μ l, infusão retrógrada no ducto bileo-pancreático). O grupo controle recebeu somente solução salina. Após jejum de 18 h os animais receberam por gavagem 350 μ l da refeição padrão. Decorridos 20 minutos após a administração do marcador os animais foram sacrificados e o trânsito intestinal foi avaliado por espectrofotometria. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo. a $p < 0,05$ vs grupo Salina e Sham; b $p < 0,05$ vs grupo TLC-S; ANOVA e teste Newman-Keuls.

4.7.3. Efeito da Fucoïdina Sobre o Centro Geométrico da Refeição na Pancreatite Aguda Induzida por TLC-S

Com o intuito de avaliar a distribuição da refeição no trato digestório como medida do trânsito gastrointestinal, avaliamos o centro geométrico da refeição. Na figura 17, observamos que a pancreatite aguda induzida por TLC-S promoveu uma distribuição da refeição nos segmentos mais proximais do trato gastrointestinal, quando comparado aos grupos controle.

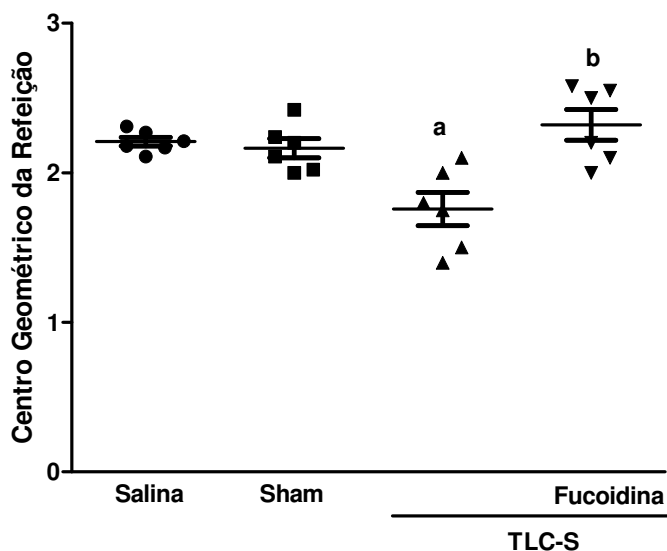
Os animais tratados com fucoïdina apresentaram uma reversão do retardo do centro geométrico da refeição promovido pela pancreatite aguda induzida por TLC-S, com uma distribuição da refeição semelhante aos grupos controle (**Figura 17**).

4.7.4. Efeito da Fucoïdina Sobre a Atividade de MPO no Estômago e Jejuno na Pancreatite Aguda Induzida por TLC-S

A pancreatite aguda induzida por TLC-S promoveu um processo inflamatório no trato gastrointestinal com aumento significativo na atividade de MPO no estômago (**Figura 18A**) e no jejuno (**Figura 18B**), em comparação com os grupos controle.

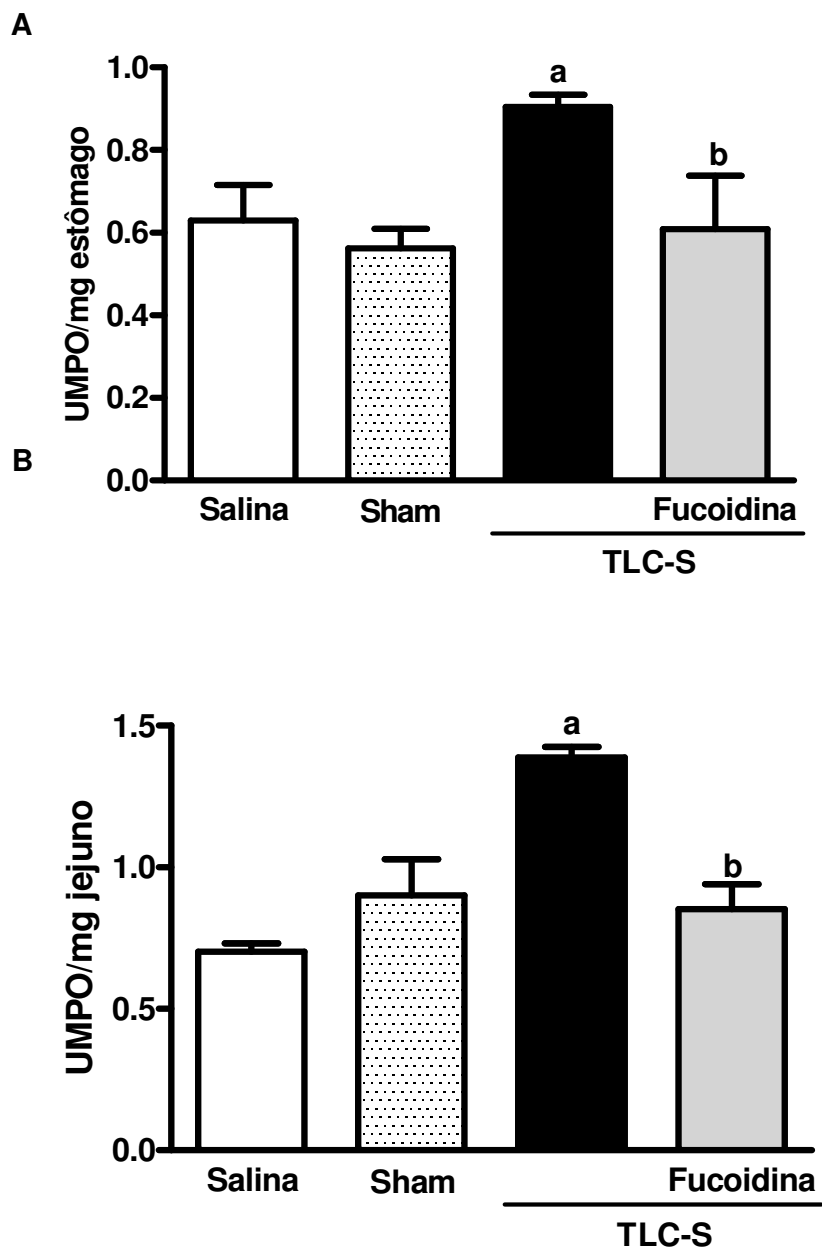
O tratamento com fucoïdina foi capaz de reduzir de forma significativa o aumento na atividade de MPO promovido pela pancreatite aguda induzida por TLC-S. Essa redução foi de 98% no estômago (**Figura 18A**), e 95% no jejuno (**Figura 18B**).

Figura 17 - Efeito da fucoïdina sobre o centro geométrico da refeição na pancreatite aguda induzida por TLC-S



Fucoïdina foi administrada (25 mg/kg, iv) 30 min antes da indução da pancreatite por TLC-S (3%, 50 µl, infusão retrógrada no ducto bileo-pancreático). O grupo controle recebeu somente solução salina. Após jejum de 18h os animais receberam por gavagem 350µl da refeição padrão. Decorridos 20 minutos após a administração do marcador os animais foram sacrificados e o centro geométrico da refeição foi avaliado por espectrofotometria. Os valores foram expressos como média ± E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo. a $p < 0,05$ vs grupo Salina e Sham; b $p < 0,05$ vs grupo TLC-S; ANOVA e teste Newman-Keuls.

Figura 18 - Efeito da fucoidina sobre a atividade de MPO no estômago e no jejuno na pancreatite aguda induzida por TLC-S



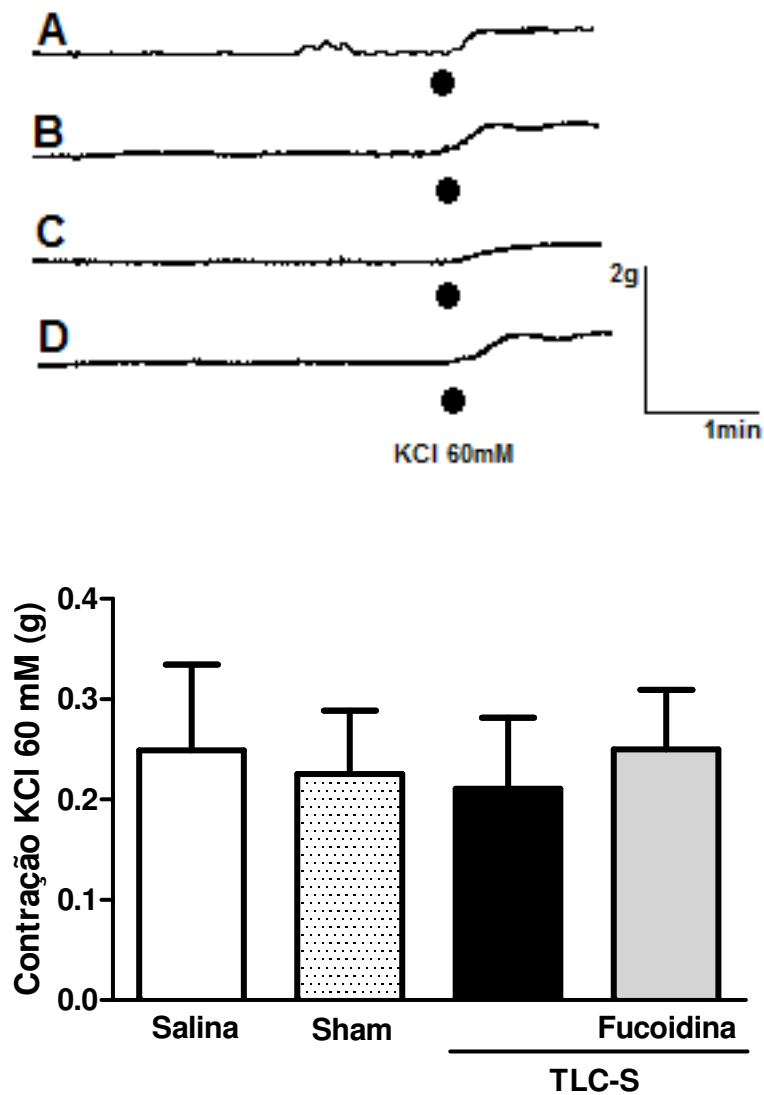
O tratamento com fucoidina reverteu o aumento da atividade de MPO no estômago (painel A) e no jejuno (painel B) durante a pancreatite aguda induzida por TLC-S (3%, 50 μ L, infusão retrógrada no ducto bileo-pancreático). Fucoidina foi administrada (25 mg/kg, iv) 30 min antes da indução da pancreatite. O grupo controle recebeu somente solução salina. Após 24 horas, a atividade de MPO foi medida por espectrofotometria. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de um mínimo de 6 animais por grupo. a $p < 0,05$ vs grupo Salina e Sham; b $p < 0,05$ vs grupo TLC-S grupo; ANOVA e teste Newman-Keuls.

4.7.5. Efeito da Fucoïdina Sobre a Contratibilidade *in vitro* do Músculo Liso do Fundo de Estômago na Pancreatite Aguda Induzida por TLC-S

Ao avaliar a contratibilidade *in vitro* do fundo de estômago dos animais com pancreatite aguda induzida por TLC-S, não foi observada nenhuma alteração significativa quanto a atividade contrátil desse segmento frente a todos os estímulos testados, KCl (**Figura 19**), carbacol (**Figura 20**) e estímulo elétrico (**Figura 21**), em comparação aos grupos controle.

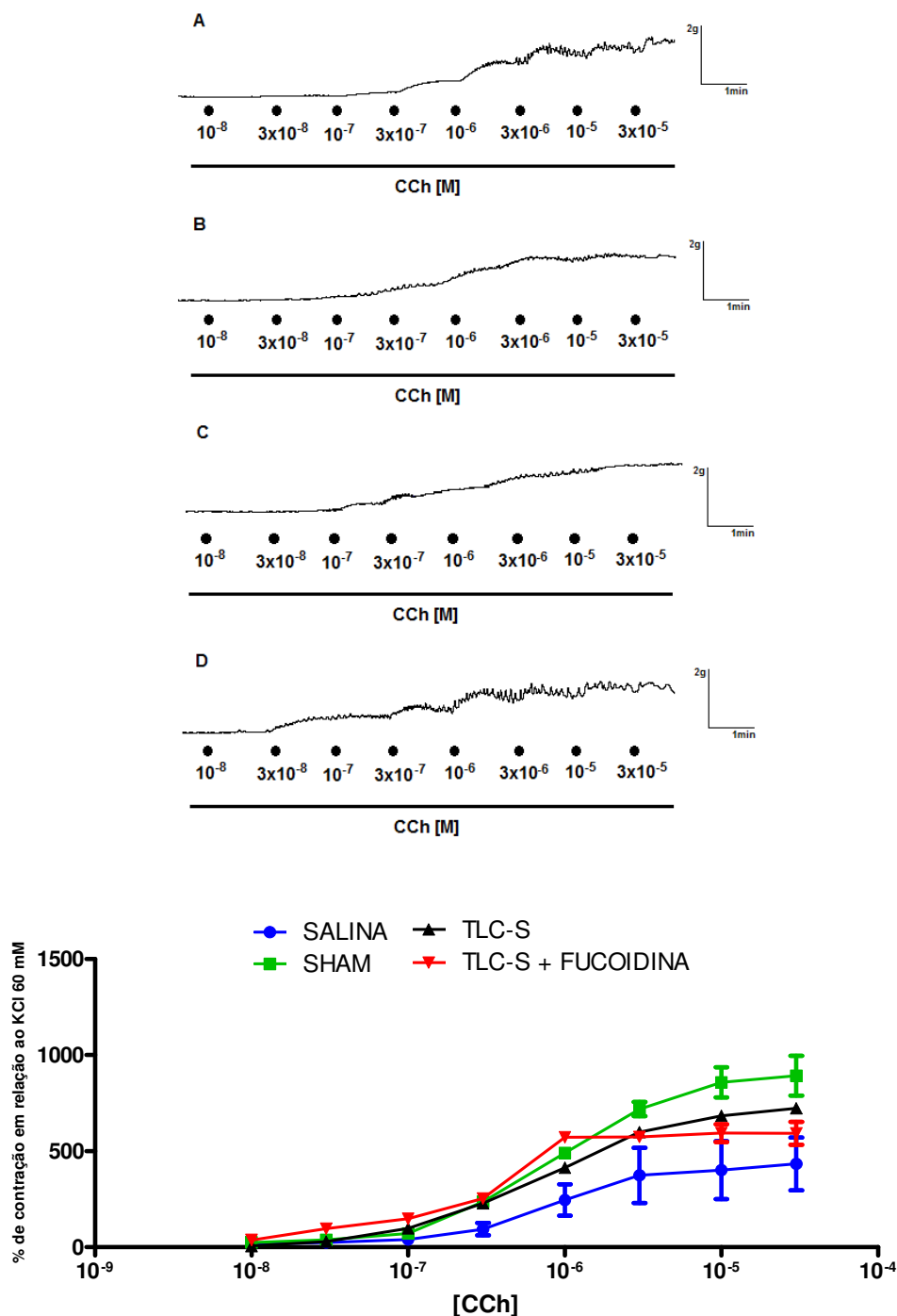
Os animais tratados com fucoïdina não apresentaram alterações de contratibilidade *in vitro* dos segmentos de estômago frente a todos os estímulos testados, quando comparado aos grupos controle ou TLC-S (**Figura 19, Figura 20 e Figura 21**).

Figura 19 - Efeito da fucoidina sobre a contratilidade *in vitro* do músculo liso do fundo de estômago estimulado por KCl na pancreatite aguda induzida por TLC-S



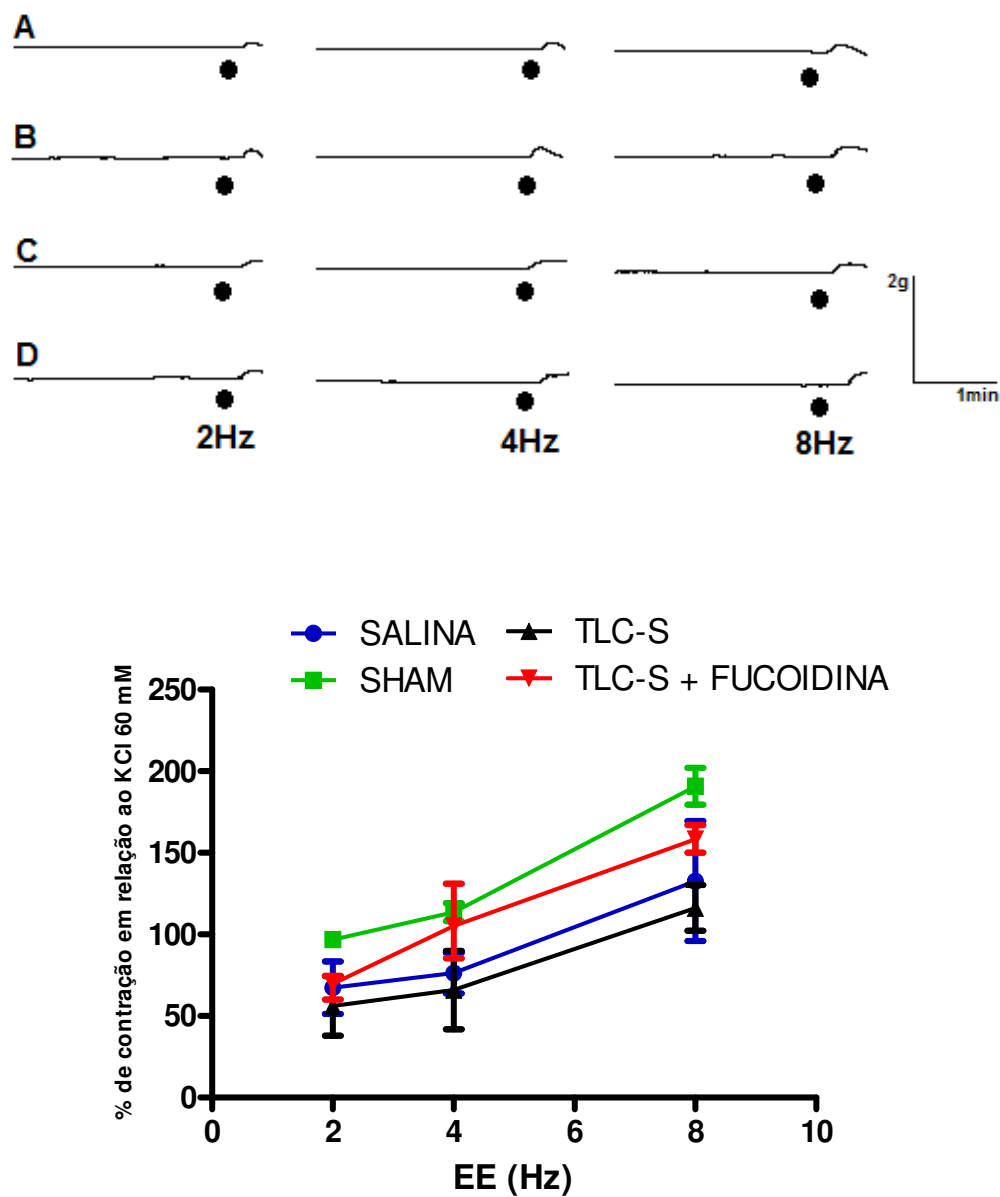
Registro típico da contratilidade do fundo de estômago dos animais salina (A), sham (B), TLC-S (C) e TLC-S + Fucoidina (D) após estímulo com KCl 60 mM. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de um mínimo de 5 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Newman-Keuls.

Figura 20 - Efeito da fucoidina sobre a contratilidade *in vitro* do músculo liso do fundo de estômago estimulado por carbacol na pancreatite aguda induzida por TLC-S



Registro típico da contratilidade do fundo de estômago dos animais salina (A), sham (B), TLC-S (C) e TLC-S + Fucoidina (D) após estímulo com concentrações cumulativas de carbacol (0,01-30 μ M). Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de um mínimo de 5 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Newman-Keuls.

Figura 21 - Efeito da fucoidina sobre a contratilidade *in vitro* do músculo liso do fundo de estômago estimulado eletricamente na pancreatite aguda induzida por TLC-S



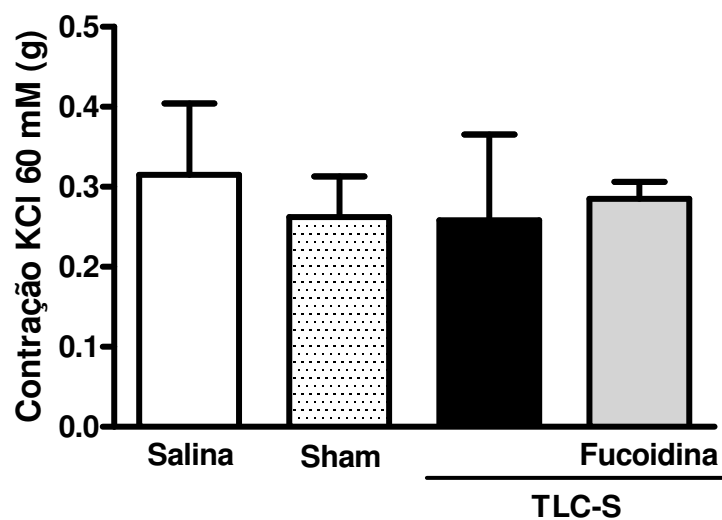
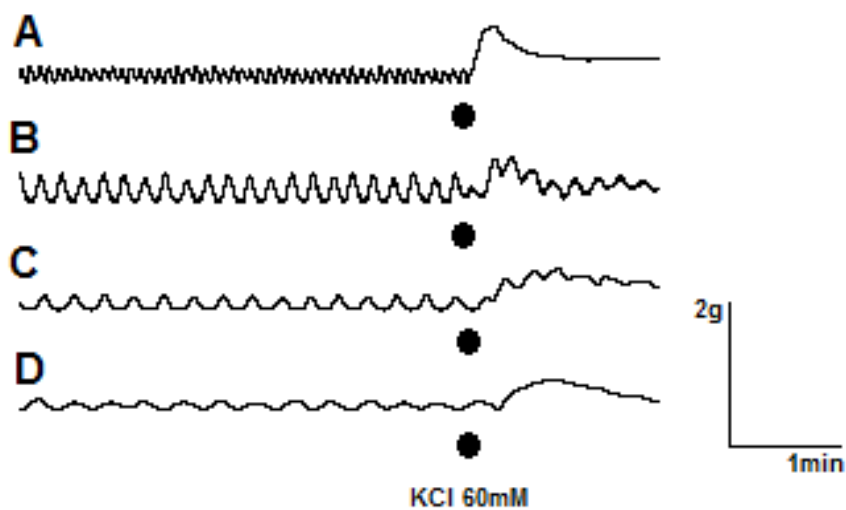
Registro típico da contratilidade do fundo de estômago dos animais salina (A), sham (B), TLC-S (C) e TLC-S + Fucoïdina (D) após estimulação elétrica (2, 4 e 8 Hz, 40V, 1ms, duração do pulso de 10s). Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de um mínimo de 5 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Newman-Keuls.

4.7.6. Efeito da Fucoïdina Sobre a Contratilidade *in vitro* do Músculo Liso do Jejuno na Pancreatite Aguda Induzida por TLC-S

Os animais dos grupos controle e TLC-S não apresentaram diferenças significativas na atividade contrátil frente ao estímulo despolarizante KCl 60 mM (**Figura 22**). Em contrapartida, a pancreatite induzida por TLC-S promoveu uma hipercontratilidade do jejuno quando estimulado com carbacol nas concentrações de 1 e 3 μ M (CCh 1 μ M, salina = $63,15 \pm 5,87\%$, sham = $67,75 \pm 10,30\%$, TLC-S = $97,77 \pm 5,30\%$; CCh 3 μ M, salina = $68,74 \pm 9,68\%$, sham = $76,90 \pm 11,59\%$, TLC-S = $111,6 \pm 4,07\%$), em relação à contração dos grupos controle (**Figura 23**). Os segmentos de jejuno dos animais do grupo TLC-S também apresentaram uma maior resposta contrátil frente ao estímulo elétrico quando aplicada a frequência de 8Hz (EE 8Hz, salina = $65,94 \pm 6,19\%$, sham = $73,20 \pm 6,08\%$, TLC-S = $120,8 \pm 8,5$) quando comparado aos grupos controle (**Figura 24**).

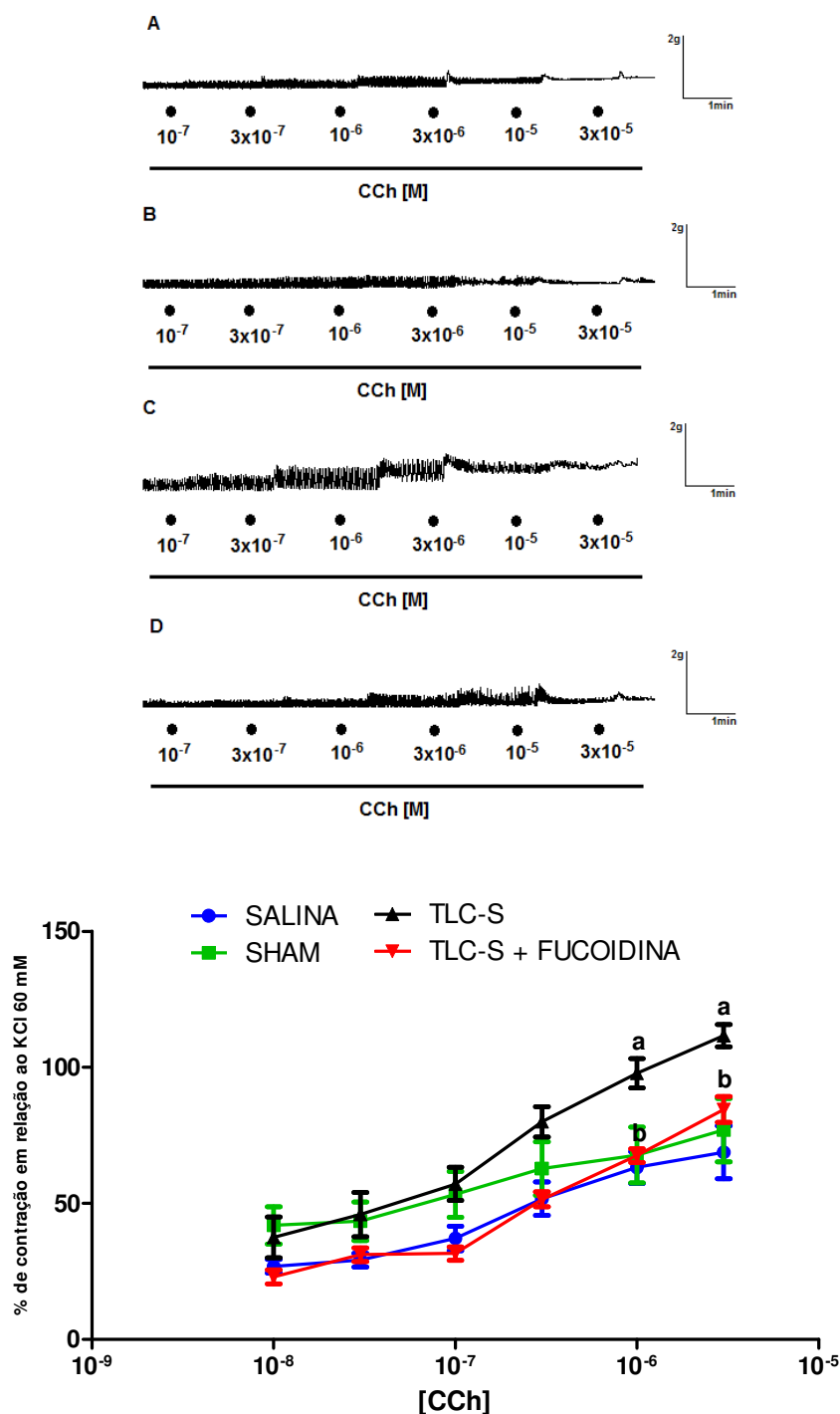
De forma semelhante ao observado para os demais grupos, o grupo que recebeu fucoïdina também não alterou a resposta contrátil do jejuno ao KCl 60 mM (**Figura 22**). Com relação às alterações de contratilidade do jejuno o tratamento com fucoïdina reverteu a hipercontratilidade induzida pelo carbacol nas concentrações de 1 e 3 μ M (CCh 1 μ M, salina = $63,15 \pm 5,87\%$, sham = $67,75 \pm 10,30\%$, TLC-S = $97,77 \pm 5,30\%$, TLC-S + Fucoïdina = $67,52 \pm 2,5\%$; CCh 3 μ M, salina = $68,74 \pm 9,68\%$, sham = $76,90 \pm 11,59\%$, TLC-S = $111,6 \pm 4,07\%$, TLC-S + Fucoïdina = $84,40 \pm 4,73\%$), em relação à contração dos grupos controle (**Figura 23**). O aumento da resposta contrátil frente ao estímulo elétrico (8 Hz) dos segmentos de jejuno dos animais com pancreatite aguda induzida por TLC-S também foi revertido pelo tratamento com fucoïdina (EE 8 Hz, salina = $65,94 \pm 6,19\%$, sham = $73,20 \pm 6,08\%$, TLC-S = $120,8 \pm 8,5$, TLC-S + Fucoïdina = $55,07 \pm 4,28$) (**Figura 24**).

Figura 22 - Efeito da fucoïdina sobre a contratilidade *in vitro* do músculo liso do jejuno estimulado por KCl na pancreatite aguda induzida por TLC-S



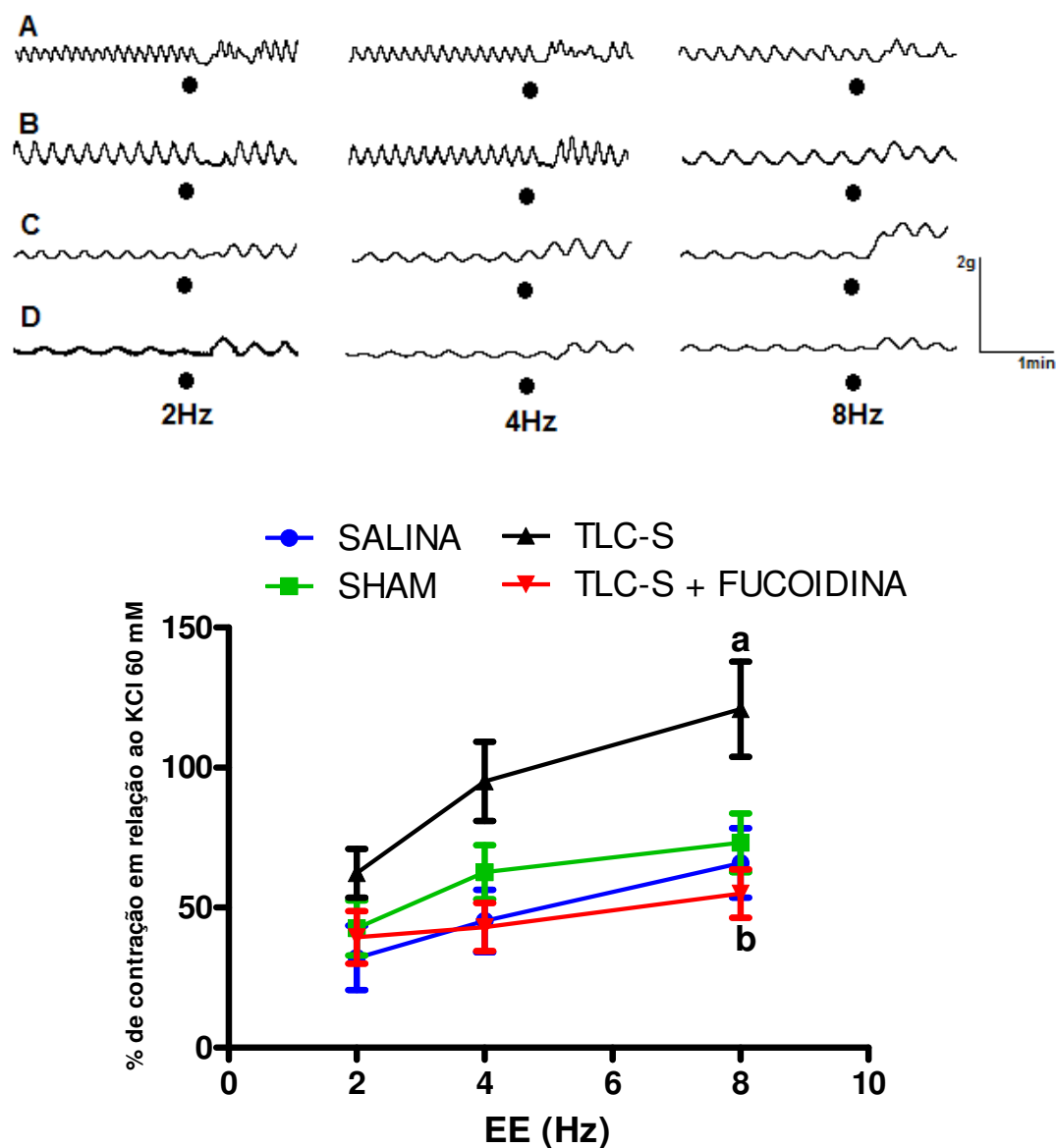
Registro típico da contratilidade do jejuno dos animais salina (A), sham (B), TLC-S (C) e TLC-S + Fucoïdina (D) após estímulo com KCl 60 mM. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de um mínimo de 5 animais por grupo. Foi utilizado o teste ANOVA seguido de Newman-Keuls.

Figura 23 - Efeito da fucoidina sobre a contratilidade *in vitro* do músculo liso do jejuno estimulado por carbacol na pancreatite aguda induzida por TLC-S



Registro típico da contratilidade do jejuno dos animais salina (A), sham (B), TLC-S (C) e TLC-S + Fucoidina (D) após estímulo com concentrações cumulativas de carbacol (0,01-3 μ M). Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de um mínimo de 5 animais por grupo. a $p < 0,05$ vs grupo Salina e Sham; b $p < 0,05$ vs grupo TLC-S grupo; ANOVA e teste Newman-Keuls.

Figura 24 - Efeito da fucoidina sobre a contratilidade *in vitro* do músculo liso do jejuno estimulado eletricamente na pancreatite aguda induzida por TLC-S



Registro típico da contratilidade do jejuno dos animais salina (A), sham (B), TLC-S (C) e TLC-S + Fucoidina (D) após estimulação elétrica (2, 4 e 8 Hz, 40V, 1ms, duração do pulso de 10s). Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de um mínimo de 5 animais por grupo. a $p < 0,05$ vs grupo Salina e Sham; b $p < 0,05$ vs grupo TLC-S grupo; ANOVA e teste Newman-Keuls.

5. DISCUSSÃO

A pancreatite aguda é uma desordem inflamatória do pâncreas frequentemente associada a altas taxas de mortalidade, sendo a síndrome da resposta inflamatória sistêmica e a disfunção múltipla de órgãos fatores determinantes do prognóstico desta patologia (KYLANPAA et al., 2012). Íleo paralítico constitui outra frequente complicação da pancreatite aguda, especialmente nos casos mais graves (ZHOU et al., 2011). Sabe-se que neutrófilos desempenham um papel importante na fisiopatologia da pancreatite aguda (ABDULLA et al., 2011). Este trabalho mostra o efeito protetor da fucoidina, um inibidor da migração de neutrófilos através da inibição das moléculas de adesão P e L-selectina, sobre os parâmetros inflamatórios e dismotilidades gastrintestinais presentes em dois modelos de pancreatite aguda experimental.

A administração de repetidas injeções de ceruleína, um análogo da colecistocinina e secretagogo pancreático, é um dos modelos experimentais de pancreatite aguda mais utilizados, visto que é capaz de reproduzir grande parte das alterações que ocorrem na pancreatite aguda que acomete seres humanos (VAN WESTERLOO et al., 2003). A dose e o número de injeções de ceruleína determinam a gravidade da pancreatite aguda obtida (CHAN e LEUNG, 2007). Neste trabalho, com o objetivo de obter uma pancreatite aguda grave, com comprometimento de órgãos à distância, ceruleína foi administrada 12 vezes, com uma hora de intervalo entre cada administração. Enquanto colecistocinina estimula as células acinares a produzirem uma secreção rica em enzimas que atuam no processo digestório, a hiperestimulação com ceruleína leva a pancreatite aguda caracterizada por dano às células acinares pancreáticas, níveis elevados das enzimas amilase e lipase, intenso infiltrado inflamatório para o pâncreas e o pulmão, além da produção de citocinas pró-inflamatórias (CHAN e LEUNG, 2007; PATERNITI et al., 2012), parâmetros esses avaliados em nosso estudo. O segundo modelo utilizado foi a infusão retrógrada no ducto bileo-pancreático do sal biliar TLC-S. Este modelo experimental de pancreatite aguda baseia-se num método de indução clinicamente relevante (pancreatite biliar humana) e é caracterizado por alterações que são típicas de pancreatite aguda grave em seres humanos (LAUKKARINEN et al., 2007). Os nossos dados mostraram que TLC-S induz pancreatite grave, com aumento de

parâmetros inflamatórios e enzimas digestivas, além de necrose pancreática extensa.

Nossos resultados mostram que, em ambos os modelos de pancreatite aguda utilizados, os níveis séricos de amilase e lipase foram significativamente aumentados, o que confirma que a pancreatite aguda foi induzida com sucesso. A determinação de amilase e lipase sérica representa o método laboratorial mais utilizado para diagnosticar a pancreatite aguda, visto que alterações nos níveis dessas enzimas já estão presentes juntamente com os primeiros sintomas da doença (GRANGER e REMIK, 2005). Observamos que houve diferença entre a gravidade dos modelos que utilizamos. Por exemplo, o aumento dos níveis séricos de nitrito e das citocinas IL-1 β e TNF- α , além da MPO pancreática e pulmonar, foi maior no modelo TLC-S, em comparação com o modelo ceruleína. Esta diferença está de acordo com a literatura, que se refere à infusão retrógrada de ácidos biliares, como o TLC-S, no ducto pancreático como indutora de uma pancreatite aguda necrotizante (LAUKKARINEN et al., 2007). Entretanto, a avaliação histológica do pâncreas mostrou níveis similares de dano tecidual em ambos os modelos, o que pode ter ocorrido devido ao número de injeções de ceruleína utilizado, o que promoveu uma pancreatite aguda grave também no modelo ceruleína. Dessa forma, no nosso estudo, ambos os modelos utilizados foram de pancreatite aguda grave. O nosso interesse em trabalhar com modelos mais graves da doença advém do fato de que nos casos mais leves e moderados de pancreatite aguda em humanos esta doença apresenta-se, na maioria das vezes, auto-resolutiva, sendo as complicações e altas taxas de mortalidade e morbidade presentes nos casos graves.

Fucoidina foi eficiente em proteger contra os danos característicos da pancreatite aguda em ambos os modelos. Diversas evidências apontam para os efeitos anti-inflamatórios da fucoidina no trato gastrointestinal. Estudos mostram que fucoidina protege contra úlceras causadas por ácido acético e pela infecção por *Helicobacter pylori* (NAGAOKA et al., 2000; CUMASHI et al., 2007). Esta fucana foi capaz de prevenir a ulceração induzida por aspirina em ratos, sendo este efeito gastroprotetor resultante da modulação dos níveis de citocinas (TNF- α , IFN- γ e IL-12), do fator de crescimento epidérmico e ativação da enzima cicloxigenase (CHOI et al., 2010; RAGHAVENDRAN et al., 2011). Fucoidina também foi eficaz em proteger contra os danos gástricos e o aumento da atividade MPO gástrica em

modelos de gastropatia induzida por indometacina (SOUZA et al., 2003; SOUZA et al., 2008). Num modelo de enterite induzida pela toxina A de *Clostridium difficile* em ratos, fucoidina foi capaz de proteger contra os danos inflamatórios produzidos pela toxina como edema, secreção e perda de integridade da mucosa, atividade de adenosina deaminase e infiltrado de células inflamatórias (BARRETO et al., 2008).

A hipótese mais provável para explicar o efeito protetor da fucoidina nesses modelos de pancreatite aguda é sua ação inibitória sobre a migração de neutrófilos. Hipótese esta, validada pela redução da atividade de MPO no pâncreas e pulmão, a níveis de controle, observada nos grupos tratados com fucoidina. Adicionalmente, fucoidina reduziu significativamente o infiltrado de células inflamatórias, como verificado na histologia, no pâncreas dos animais tratados com TLC-S, um modelo de pancreatite aguda grave de importante relevância clínica (LAUKKARINEN et al., 2007). Nossos resultados estão de acordo com dados da literatura que mostram que a fucoidina inibe o acúmulo de neutrófilos em doenças inflamatórias (SHIMAOKA et al., 1996; SOUZA et al., 2003; PINTO et al., 2010). O rolamento de neutrófilos mediado pelas selectinas constitui evento crucial no processo de extravasamento de neutrófilos em diversas patologias inflamatórias como a asma (BAO et al., 2009), complicações vasculares na obesidade (WANG et al., 2012), doença cerebrovascular (TANNE et al., 2002; AMAR et al., 2006), aterosclerose (NEVES et al., 2008), metástase (DENNIS e LAFERTE, 1987; HAKOMORI, 1996; KIM e VARKI, 1997) e pancreatite aguda, estando a expressão de P-selectina aumentada em modelos experimentais de pancreatite aguda induzida por ceruleína e por taurocolato de sódio (HARTMAN et al., 2012; ABDULLA et al., 2012). As moléculas de adesão da família das selectinas ligam-se a glicoproteínas com carboidratos sulfatados e fucosilados (ZHANG et al., 2001). Fucoidina, que é um polímero de L-fucose sulfatado, possui similaridades estruturais com os ligantes endógenos das selectinas, apresentando alta afinidade *in vitro* por P e L-selectinas, bem como baixos níveis de ligação não específica (WAGNER e ROTH, 2000). Por essa razão ela tem sido largamente utilizada para avaliar o papel das selectinas e do rolamento de leucócitos em diversos estudos e, seus efeitos farmacológicos como inibidor de selectinas *in vivo* já foi descrito em diversos estudos. Zhang e cols (2001) demonstraram que o bloqueio das selectinas, pelo uso do polissacarídeo fucoidina, protege contra colite experimental, sendo este efeito associado com significativa

inibição da atividade de MPO na mucosa colônica dos animais além de pronunciada redução do rolamento e acúmulo tecidual de leucócitos induzidos por TNF- α . Estudo de Benlier e cols (2011) mostrou que fucoidina inibe o dano tecidual induzido por estímulo elétrico em ratos, reduzindo necrose, edema e número de neutrófilos. O bloqueio das selectinas pelo tratamento *in vivo* com fucoidina tem sido postulado como potencial terapia para prevenção dos danos associados à miocardite autoimune, visto que ela reduz os marcadores inflamatórios no plasma, a área de miocardite, além de inibir a infiltração de macrófagos e células T CD4⁺ no miocárdio (TANAKA et al., 2011). Em outro estudo recente, fucoidina mostrou efeito neuroprotetor em um modelo de dano cerebral isquêmico acelerado por lipopolissacarídeo através da inibição da expressão de citocinas/quimiocinas e do recrutamento de neutrófilos (KANG et al., 2012). Nossos dados estão, portanto, coerentes com a já descrita ação da fucoidina sobre as selectinas e, com a depleção de neutrófilos como sendo uma medida de proteção contra a lesão tecidual na pancreatite aguda (ZANINOVIC et al., 2000; GUKOVSKAYA e PANDOL, 2004). Recentemente, Hartman e cols (2012) mostraram que a inibição de P-selectina, pelo uso de um anticorpo anti-P-selectina, diminuiu a necrose e a hemorragia nas células acinares, bem como os níveis séricos de tripsinogênio. Dessa forma, podemos inferir que a interação entre fucoidina e selectinas resulte em inibição do rolamento de leucócitos, um passo inicial e essencial no processo de extravasamento de leucócitos na pancreatite aguda, sugerindo que P-selectina, constitui um importante componente na regulação da lesão tecidual na pancreatite aguda.

Nossos resultados mostram que fucoidina inibiu tanto a infiltração de neutrófilos quanto os níveis de citocinas pró-inflamatórias. A relação entre a inibição de selectinas e a produção de citocinas pode ser resultante da secreção de compostos pró-inflamatórios por leucócitos ativados que estimulam células residentes no pâncreas, propiciando a progressão do processo inflamatório local para uma resposta inflamatória sistêmica com dano a outros órgãos. É importante ressaltar que a secreção de TNF- α induz a ativação inicial de proteases e a necrose das células acinares na pancreatite aguda experimental (SENDER et al., 2012), sugerindo que a infiltração e ativação de células inflamatórias constituem eventos iniciais na pancreatite aguda, sendo os neutrófilos e macrófagos fundamentais no controle da doença. A liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β

ajudam a propagar o processo inflamatório de local para sistêmico. Estas citocinas são liberadas na circulação sistêmica e interagem com o endotélio vascular de órgãos distantes (principalmente o pulmão), contribuindo para a resposta inflamatória sistêmica que ocorre na pancreatite aguda grave (PATERNITI et al., 2012). Já foi descrito que o bloqueio da cascata de citocinas, a nível de IL-1 β , pelo uso do seu antagonista natural e específico (IL-1ra) ou pelo uso de camundongos nocaute para IL-1 β , diminui a pancreatite aguda induzida por ceruleína em ratos (NORMAN et al., 1995; DENHAM et al., 1997). Além disso, a inibição farmacológica e a expressão genética atenuada de TNF- α reduz a gravidade em modelos experimentais de pancreatite aguda induzida por dieta ou por ceruleína (DENHAM et al., 1997; MALLEO et al., 2007; MALLEO et al., 2008). Esses dados corroboram com nossos resultados que mostram que fucoidina reverteu o aumento de TNF- α e IL-1 β , em ambos os modelos testados, para níveis de controle, confirmando o impacto da inibição das selectinas na progressão da pancreatite aguda.

A exposição de muitos tecidos e células a citocinas pró-inflamatórias também resulta num aumento da expressão da isoforma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS), sendo que uma formação aumentada de óxido nítrico (NO), devido à indução da iNOS, está envolvida na patogênese do choque e da inflamação (SU et al., 2010). O nosso trabalho mostra que a redução na migração de neutrófilos, pelo tratamento com fucoidina, também foi capaz de reduzir os níveis aumentados de peroxidação lipídica no pâncreas, bem como a formação de NO. A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio resultantes da ativação da iNOS ou de isoformas da NADPH-oxidase, bem como de produtos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, têm sido implicada na patogênese da pancreatite aguda (LEUNG et al., 2009). Cuzzocrea e cols (2002) mostraram que camundongos nocaute para iNOS são protegidos contra a pancreatite experimental induzida por ceruleína. Existem evidências que mostram que alguns dos efeitos citotóxicos do NO ocorrem devido à formação de peroxinitrito, um oxidante reativo formado pela rápida reação do NO com o radical superóxido (PRYOR et al., 1995). Nossos dados estão de acordo com a literatura, visto que a formação de peroxinitrito pode contribuir para a lesão tecidual, induzindo um estresse oxidativo considerável, o que pode ser observado pelo grau de peroxidação lipídica, indicado por altos níveis de malondialdeído.

Vale ressaltar que outros mecanismos de ação podem estar envolvidos nos efeitos benéficos da fucoidina observados em nosso estudo. Por exemplo, fucoidina é considerada um agente polivalente, com efeitos sobre o receptor scavenger do macrófago (BARRETO et al., 2008). Adicionalmente, fucoidina pode induzir apoptose em uma série de linhagens celulares humanas (YAMASAKI-MIYAMOTO et al., 2009; KIM et al., 2010). Diversas evidências sugerem que a promoção de apoptose nas células acinares pancreáticas pode ser considerada um evento protetor (BHATIA et al., 1998; BOOTH et al., 2011). Dessa forma, a necrose, um dos principais determinantes da gravidade da pancreatite aguda, diminui em resposta a ácidos biliares, enquanto a apoptose é promovida (BOOTH et al., 2011), e a inibição da atividade das caspases leva a uma pancreatite grave (MARENINOVA et al., 2006); sendo que a ativação da via de morte celular apoptótica pela fucoidina pode ser benéfica na pancreatite aguda. Este aspecto constitui a base de estudos futuros de continuação deste trabalho. Outra possibilidade é que fucoidina, diminuindo a infiltração de neutrófilos no pâncreas, poderia inibir a ativação de tripsinogênio, um importante processo envolvido na morte das células acinares durante a pancreatite aguda (DAWRA et al., 2011). No entanto, provavelmente não é o caso. Estudos recentes mostram que a ativação precoce do tripsinogênio não é dependente de infiltração de neutrófilos, e a progressão da inflamação local e sistêmica na pancreatite aguda não necessita de ativação de tripsinogênio, sugerindo que a ativação proteolítica é um processo dinâmico, caracterizado por uma fase inicial independente da presença dos neutrófilos e uma fase tardia dependente de neutrófilos (DAWRA et al., 2011; HARTMAN et al., 2012; ABDULLA et al., 2012).

Em doentes com pancreatite aguda grave, sintomas relacionados à distúrbios na motilidade gastrointestinal como distensão abdominal, náuseas, vômitos e parada da eliminação de fezes estão frequentemente presentes (ZHOU et al., 2012). Atualmente a infecção associada a pancreatite aguda é considerada um fator de suma importância para morbidade e mortalidade que ocorre nos casos de pancreatite aguda necrotizante (FRITZ et al., 2008). Evidências clínicas sugerem que a pancreatite aguda necrotizante promove íleo parálítico, o que favorece o crescimento e translocação bacteriana, sendo este um dos principais fatores na patogênese da sepse induzida na pancreatite (UHL et al., 1996; WANG et al., 2003).

Dessa forma, a melhora das dismotilidades gastrintestinais associadas à pancreatite aguda é de suma importância para redução dos graves riscos associados a essa complicação, entretanto, ainda não existe tratamento específico para os distúrbios de motilidade associados à pancreatite aguda.

Os estudos experimentais sobre as alterações de motilidade gastrintestinal na pancreatite aguda ainda são escassos, e a patogênese desse sintoma ainda se encontra indefinida (SEERDEN et al., 2005). A escolha do modelo experimental para o estudo dessas alterações constitui fator determinante para o sucesso da investigação, visto que se deve assegurar que os métodos e/ou agentes utilizados para induzir a pancreatite não promovem alteração de motilidade gastrintestinal *per se* (ZHOU et al., 2011). Colecistocinina é um hormônio que, liberado fisiologicamente no intestino, causa alterações no esvaziamento gástrico e na atividade motora do intestino delgado e cólon (DEBAS et al., 1975; STORR et al., 2003). Ceruleína, por ser um análogo da colecistocinina, é capaz de afetar a atividade motora do trato gastrintestinal (STORR et al., 2003), impossibilitando maiores estudos sobre estas alterações utilizando o modelo de pancreatite aguda induzida por ceruleína. Por esta razão, decidimos realizar a investigação sobre as alterações de motilidade do trato gastrintestinal no modelo de pancreatite aguda induzida por TLC-S.

Os modelos de pancreatite aguda induzida pela administração retrógrada de ácidos biliares no ducto pancreático são os mais utilizados para o estudo da fisiopatologia, bem como, de possíveis terapias para pancreatite aguda, devido a sua maior similaridade com a pancreatite aguda clínica (CHAN e LEUNG, 2007). Nosso estudo é o primeiro a relatar alterações *in vivo* e *in vitro* de motilidade gastrintestinal num modelo de pancreatite aguda por TLC-S. Nós mostramos que ocorre retardo no esvaziamento gástrico e trânsito gastrintestinal nos animais tratados com TLC-S e, a despeito das críticas a avaliação de motilidade gastrintestinal em modelos cirúrgicos de pancreatite aguda, nosso estudo mostrou que os animais dos grupos salina e sham, que também foram submetidos ao procedimento cirúrgico, apresentaram taxas normais de retenção gástrica e trânsito gastrintestinal.

Distúrbios do esvaziamento gástrico e trânsito gastrintestinal estão presentes em patologias que envolvem um importante componente inflamatório gástrico e/ou

intestinal, como na úlcera péptica (KERRIGAN et al., 1991). Na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil, onde há um componente inflamatório significativo, com infiltração de neutrófilos e aumento dos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e KC, ocorre retardo do trânsito intestinal e do esvaziamento gástrico de líquidos, acompanhado de hipercontratilidade do fundo gástrico e duodeno dos animais tratados com este antineoplásico (SOARES et al., 2008). A sepse é outra condição associada à produção de mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, dentre outros, que promove distúrbios de motilidade gastrointestinal. Estudos mostram que durante a sepse ocorre uma diminuição do esvaziamento gástrico e do trânsito intestinal, acompanhado de hipocontratilidade do músculo liso intestinal (DE WINTER et al., 2005; DE FILIPPIS et al., 2008; KÖNIGSRAINER et al., 2011).

O retarde no esvaziamento gástrico pode ocorrer devido a um aumento na complacência gástrica e/ou a um aumento na resistência antro-duodenal (HABA; SARNA, 1993). Nos estudos de contratilidade *in vitro*, nós verificamos que o fundo gástrico dos animais com pancreatite aguda induzida por TLC-S não apresentou alterações contráteis significativas em relação aos grupos controle, já os segmentos de jejuno apresentaram uma hipercontratilidade em resposta ao carbacol e ao estímulo elétrico, no grupo com pancreatite aguda. Uma vez que o trânsito gastrointestinal é o resultado final de esvaziamento gástrico e trânsito intestinal, o atraso no trânsito gastrointestinal observado em nosso estudo pode ser secundário ao retarde do esvaziamento gástrico. Estes resultados nos permitem inferir que o retarde no esvaziamento gástrico e no trânsito gastrointestinal durante a pancreatite aguda induzida por TLC-S não ocorre devido a uma alteração na complacência gástrica e sim envolve uma maior resistência do intestino delgado proximal ao processo de esvaziamento gástrico. Outra possibilidade adicional é que a pancreatite aguda induz tanto dano gástrico quanto intestinal, uma vez que os níveis de MPO encontram-se aumentados no estômago e no jejuno desses animais, e em seguida, a inflamação induz a dismotilidade gastrointestinal.

Nossos resultados contradizem, em parte, os estudos de SEERDEN e cols. (2005) que demonstrou que durante a pancreatite aguda induzida por dieta deficiente em colina e suplementada com etionina em camundongos, o esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal de semi-sólidos encontram-se significativamente diminuídos e que ocorre uma pequena diminuição da

contratilidade *in vitro* mediada pela substância P no fundo gástrico e, uma redução global da contratilidade *in vitro* no jejuno em resposta ao carbacol e ao estímulo elétrico. Este modelo de pancreatite experimental induzido por dieta, apesar de apresentar a vantagem de ser um método não-invasivo, não possui relevância clínica importante (CHAN e LEUNG, 2007). A hipótese mais aceita para explicar a indução de pancreatite aguda neste modelo é que a etionina pode ser tóxica para o pâncreas, interferindo com a síntese de RNA, proteínas e com o metabolismo de fosfolípidos. A deficiência de colina atua de maneira sinérgica com etionina, promovendo aumento da severidade da pancreatite (LOMBARDI, 1975; CHAN e LEUNG, 2007). Outra desvantagem desse modelo é que ele mostra-se específico à espécie e ao sexo. Camundongos machos não desenvolvem pancreatite necrotizante neste modelo, porém a administração de estrógenos torna esses animais suscetíveis à indução de pancreatite por dieta (RAO et al., 1982). Outro ponto questionável deste modelo é que a etionina e a colina afetam diretamente outros órgãos, incluindo o fígado e o cérebro. Sua inespecificidade torna-o um modelo inadequado para estudar a fisiopatologia da pancreatite aguda, principalmente quando o objetivo é avaliar a disfunção de múltiplos órgãos (CHAN e LEUNG, 2007). As diferenças entre a contratilidade *in vitro* do jejuno encontradas em nosso estudo e aquelas observadas na literatura podem ocorrer devido ao modelo de pancreatite utilizado, o que proporciona diferentes graus de pancreatite, inflamação sistêmica e disfunção de órgãos. Além disso, outros estudos também demonstram um aumento significativo na contratilidade do músculo gastrointestinal em resposta ao carbacol em situações de infecção, como na infecção por *Trichinella spiralis* (VERMILLION; COLLINS, 1988) em ratos ou durante a inflamação induzida por *Schistosoma* em camundongos (MOREELS et al., 2001).

Diversos mecanismos podem estar relacionados ao aumento da contratilidade *in vitro* observado nos segmentos de jejuno dos animais com pancreatite aguda induzida por TLC-S, dentre eles destacaremos alguns que consideramos mais significativos para o nosso estudo. A exacerbação contrátil intestinal durante processos inflamatórios pode envolver um aumento da massa muscular total sem, no entanto, haver aumento na capacidade contrátil de cada célula individualmente (MOREELS et al., 2001). A literatura relata que contrações induzidas por altas concentrações extracelulares de potássio são mediadas por uma despolarização de

membrana e conseqüente aumento do influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, independente de receptor (GODFRAIND e KABA, 1969). Logo, um aumento da massa muscular total, devido ao processo inflamatório previamente estabelecido, promove um aumento na capacidade contrátil muscular frente a estímulos como o KCl (60 mM). Dessa forma, um dos possíveis mecanismos envolvidos no aumento da contratilidade de jejuno *in vitro* observado na pancreatite aguda induzida por TLC-S seria o aumento da massa muscular total. Esse mecanismo, porém, é pouco provável visto que não foi observado aumento na resposta contrátil dos grupos testados frente à solução despolarizante de KCl (60 mM). Estudos de Okada e cols (2009) mostraram que o aumento dos receptores muscarínicos está associado às dismotilidades gastrintestinais durante a diabetes, dessa forma, outro possível mecanismo que devemos considerar é a possibilidade de *up-regulation* de receptores de mediadores contráteis, como acetilcolina, visto que observamos um aumento significativo da resposta contrátil do jejuno dos animais com pancreatite aguda ao agonista colinérgico carbacol e à estimulação elétrica. Porém maiores estudos são necessários para confirmar esta hipótese. Outra possibilidade é uma redução na atividade e/ou densidade dos neurônios inibitórios, presentes no plexo mioentérico dos animais com pancreatite aguda induzida por TLC-S. No sistema nervoso entérico os neurônios nNOS (óxido nítrico sintase neuronal), participam da indução do relaxamento do músculo liso, liberando NO, que é o principal neurotransmissor NANC (não-adrenérgico não-colinérgico) (ZHOU et al., 2011). Dados recentes da literatura mostram resultados controversos sobre a densidade neuronal no íleo de camundongos com pancreatite aguda experimental. Lin e cols (2011) demonstraram que ocorre um aumento na proporção de neurônios nitrérgicos no íleo de camundongos submetidos à infusão de taurocolato do ducto pancreático. Já os estudos de Zhou e cols (2001 e 2012) mostram que ocorre um comprometimento funcional progressivo das células intersticiais de Cajal acompanhado de redução na densidade de neurônios nitrérgicos do íleo e que, o tratamento dos animais com octreotide ameniza a dismotilidade do intestino delgado, o que pode estar relacionado com a atenuação da lesão nas células intersticiais de Cajal e à capacidade inibitória do octreotide sobre a liberação de peptídeos e citocinas pró-inflamatórias. Vale ressaltar que o comprometimento funcional dos neurônios nNOS pode ocorrer tanto por sua destruição seletiva, quanto por uma redução na expressão da enzima nNOS nos neurônios entéricos. Porém, no

presente estudo não avaliamos a densidade neuronal nNOS no plexo mioentérico, nem a atividade da nNOS. Vale ressaltar que, nenhuma medida de parâmetros inflamatórios gastrintestinais foi realizada nesses estudos, não permitindo uma correlação direta entre a inflamação sistêmica decorrente da pancreatite aguda necrotizante e os achados de motilidade e função gastrintestinal.

O tratamento com fucoidina preveniu as alterações de motilidade gastrintestinal *in vivo* e *in vitro*, bem como inibiu a infiltração de neutrófilos no estômago e jejuno dos animais com pancreatite aguda induzida por TLC-S. Dados da literatura mostram que a redução do processo inflamatório reverte as dismotilidades gastrintestinais associadas a diversas patologias como, por exemplo, o uso do antagonista de receptores de IL-1 β , IL-1Ra, bem como de drogas que diminuem os níveis de TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias, reverte o retardo de motilidade gastrintestinal induzido pelo LPS (KONIGSRAINER et al., 2011; TSUCHIYA et al., 2012). Mediadores inflamatórios liberados no trato gastrintestinal causam dismotilidades atuando diretamente sobre as células do músculo liso ou ativando uma via neuronal inibitória (KONIGSRAINER et al., 2011). Dessa forma, os mecanismos envolvidos no efeito protetor da fucoidina sobre as alterações motoras gastrintestinais induzidas na pancreatite aguda por TLC-S podem envolver: 1) a ação inibitória da fucoidina sobre o processo inflamatório sistêmico, visto que o processo inflamatório pode agir globalmente, ativando uma via motora inibitória neuronal; 2) a ação da fucoidina impedindo o aumento dos níveis locais de infiltração neutrofílica no estômago e jejuno, o que previne a ação de mediadores inflamatórios liberados que podem agir localmente, tendo um efeito direto sobre as células do músculo liso ou neurônios entéricos.

A associação do dano inflamatório gastrintestinal com as alterações de motilidade gastrintestinal em camundongos demonstradas nesse trabalho fornece subsídios para uma melhor compreensão de como a pancreatite aguda grave induz dismotilidades gastrintestinais nos pacientes acometidos por esta patologia. Por fim, este estudo demonstra que o tratamento com fucoidina reduz a gravidade de dois modelos experimentais de pancreatite aguda grave, sugerindo que a inibição da infiltração de neutrófilos via modulação de selectinas constitui um campo promissor para o desenvolvimento de novas terapias para esta patologia.

6. CONCLUSÕES

- ✓ O tratamento com o inibidor de P e L-selectinas, fucoidina, foi eficaz em reduzir os parâmetros inflamatórios, locais e sistêmicos, e as dismotilidades gastrintestinais em dois modelos experimentais de pancreatite aguda grave em camundongos;
- ✓ Fucoidina preveniu o aumento nos níveis séricos de amilase, lipase, citocinas (IL-1 β e TNF- α), nitrito e malondialdeído pancreático na pancreatite aguda induzida por ceruleína e por TLC-S;
- ✓ O mecanismo de ação da fucoidina envolve a redução dos níveis de infiltração de neutrófilos no pâncreas, pulmão, estômago e jejuno dos animais com pancreatite aguda induzida por ceruleína e por TLC-S;
- ✓ A pancreatite aguda induzida por TLC-S promoveu importante retardo do esvaziamento gástrico e trânsito gastrintestinal além de hipercontratilidade em segmentos de jejuno *in vitro*;
- ✓ O tratamento com fucoidina foi capaz de prevenir as alterações de motilidade gastrintestinal *in vivo* e *in vitro* promovidas pela pancreatite aguda induzida por TLC-S.

REFERÊNCIAS

- ABDULLA, A.; AWLA, D.; THORLACIUS, H.; REGNER, S. Role of neutrophils in the activation of trypsinogen in severe acute pancreatitis. **J. Leukoc. Biol.** v. 90 (5), p. 975–982, 2011.
- ABDULLA, A.; AWLA, D.; HARTMAN, H.; WEIBER, H.; JEPPSSON, B.; REGNÉR, S.; THORLACIUS, H. Platelets regulate P-selectin expression and leukocyte rolling in inflamed venules of the pancreas. **Eur J Pharmacol.** v. 5, 682(1-3), p. 153-60, 2012.
- AHO, H.J.; KOSKENSALO, S.M.; NEVALAINEN, T.J. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. **Scand J Gastroenterol.** v. 15(4), p. 411-6, 1980.
- AMAR, J.; FAUVEL, J.; DROUET, L.; RUIDAVETS, J.B.; PERRET, B.; CHAMONTIN, B.; BOCCALON, H.; FERRIERES, J. Interleukin 6 is associated with subclinical atherosclerosis: a link with soluble intercellular adhesion molecule 1. **J Hypertens.** v. 24, p. 1089-1095, 2006.
- AMMANN, R.W.; MUELLHAUPT, B. Progression of alcoholic acute to chronic pancreatitis. **Gut.** v.35, p. 552-556, 1994.
- AUBÉ, A. C.; BLOTTIERE, H. M.; SCARPIGNATO, C.; CHERBUT, C.; ROZÉ, C.; GALMICHE, J. P. Inhibition of acetylcholine induced intestinal motility by interleukin 1 β in the rat. **Gut.**, v. 39, p. 470-474, 1996.
- AWLA, D.; ABDULLA, A.; ZHANG, S.; ROLLER, J.; MENGER, M.D.; REGNÉR, S.; THORLACIUS, H. Lymphocyte function antigen-1 regulates neutrophil recruitment and tissue damage in acute pancreatitis. **Br J Pharmacol.** v. 163(2), p. 413-23, 2011.
- BANG, U.C.; SEMB, S.; NOJGAARD, C.; BENDTSEN, F. Pharmacological approach to acute pancreatitis. **World J Gastroenterol.** v. 14, p. 2968–2976, 2008.
- BANKS, P.A.; FREEMAN, M.L. Practice guidelines in acute pancreatitis. **Am J Gastroenterol**, v. 101, p. 2379-2400, 2006.
- BANKS, P.A.; BOLLEN, T.L.; DERVENIS, C.; GOOSZEN, H.G.; JOHNSON, C.D.; SARR, M.G.; TSIOTOS, G.G.; VEGE, S.S. Acute Pancreatitis Classification Working Group. Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. **Gut.** v. 62(1), p. 102-11, 2013.
- BAO, Z.; GUAN, S.; CHENG, C.; WU, S.; WONG, S.H.; KEMENY, D.M.; LEUNG, B.P.; WONG, W.S. A novel antiinflammatory role for andrographolide in asthma via inhibition of the nuclear factor-kappaB pathway. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 15;179(8), p. 657-65, 2009.
- BARRETO, A.R.; CAVALCANTE, I.C.; CASTRO, M.V.; JUNQUEIRA, A.F.; VALE, M.R.; RIBEIRO, R.A.; SOUZ, A M.H.; BRITO, G.A. Fucoidin prevents Clostridium

difficile toxin-A-induced ileal enteritis in mice. **Dig Dis Sci.** v. 53(4), p. 990-6, 2008.

BHATIA, M.; SALUJA, A.K.; HOFBAUER, B.; FROSSARD, J.L.; LEE H.S.; CASTAGLIUOLO, I.; WANG, C.C.; GERARD, N.; POTHOUKAKIS, C.; STEER, M.L. Role of substance P and the neurokinin 1 receptor in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.95, p. 4760-4765, 1998.

BHATIA, M; WONG, F.L; CAO, Y; LAU, H.Y; HUANG, J; *Et al.* Pathophysiology of acute pancreatitis. **Pancreatology.** 5: 132–144, 2005.

BEGER, H.G.; KRAUTZBERGER, W.; BITTNER, R.; BLOCK, S.; BÜCHLER, M. Results of surgical treatment of necrotizing pancreatitis. **World J Surg**, v. 9, p. 972-979, 1985.

BENLIER, E; ESKIOCAK, S; PUYAN, F.O; KANDULU, H; UNAL, Y; TOP, H; AYGIT, A.C. Fucoidin, a neutrophil rolling inhibitor, reduces damage in a rat electrical burn injury model. *Burns.* 2011 Nov;37(7):1216-21.

BOOTH, D.M; MUKHERJEE, R; SUTTON, R; CRIDDLE, D.N. Calcium and reactive oxygen species in acute pancreatitis: friend or foe? **Antioxid Redox Signal**, v.15, n.10, Nov 15, p.2683-98. 2011.

BORNSTEIN, J.C.; COSTA, M.; GRIDER, J.R. Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. **Neurogastroenterol. Motil.**, v.16, n. 1 , p. 34-38, 2004.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. **Immunity** v. 24;33(5), p. 657-70, 2010.

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

BRANUM, G.; GALLOWAY, J.; HIRCHOWITZ, W.; FENDLEY, M.; HUNTER, J. – Pancreatic necrosis. Results of necrosectomy, packing, and ultimate closure over drains. **Ann Surg**, v. 227, p. 870-877, 1998.

CAMPOS, T; PARREIRA, J. G; UTIYAMA, E; RASSLAN, S. Pesquisa nacional sobre condutas na pancreatite aguda. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v.35, p.304-310. 2008.

CARROLL, J.K.; HERRICK, B.; GIPSON, T.; LEE, S.P. Acute pancreatitis: diagnosis, prognosis, and treatment. **Am Fam Physician.**, v. 75(10), p. 1513-1520, 2007.

CHAN, Y.C.; LEUNG, P.S. Acute pancreatitis: animal models and recent advances in basic research. **Pancreas.** v. 34(1), p. 1-14, 2007.

CHAVAKIS, E.; CHOI, E.Y.; CHAVAKIS T. Novel aspects in the regulation of the leukocyte adhesion cascade. **Tromb. Haemost., Frankfurt**, v. 102, p.191-197, 2009.

CHEN, J.Y; CHIU, J.H; CHEN, H.L; CHEN, T.W; YANG, W.C; YANG, A.H. Human peritoneal mesothelial cells produce nitric oxide: induction by cytokines. **Perit Dial Int.** v. 20 (6), p. 772-7, 2000.

CHIARI, H. Ueber die Selbstverdauung des menschlichen Pankreas [On autodigestion of the human pancreas]. **Z Helik.**v. 17:1, 1896.

CHOI, J.I; RAGHAVENDRAN, H.R; SUNG, N.Y; KIM, J.H; CHUN, B.S; AHN, D.H; CHOI, H.S; KANG, K.W; LEE, J.W. Effect of fucoidan on aspirin-induced stomach ulceration in rats. **Chem Biol Interact.** v. 5;183(1), p.249-54, 2010.

CRIDDLE, D.N; RARATY, M.G; NEOPTOLEMOS, J.P; TEPIKIN, A.V; PETERSEN, O.H; SUTTON R. Ethanol toxicity in pancreatic acinar cells: mediation by nonoxidative fatty acid metabolites. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.101, n.29, Jul 20, p.10738-43. 2004.

CRIDDLE, D.N; GILLIES, S; BAUMGARTNER-WILSON, H.K; JAFFAR, M; CHINJE, E.C; PASSMORE, S; CHVANOV, M; BARROW, S; GERASIMENKO, O.V; TEPIKIN, A.V; SUTTON, R; PETERSEN, O.H. Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. **J Biol Chem**, v.281, n.52, Dec 29, p.40485-92. 2006.

CRIDDLE, D.N; GERASIMENKO, J.V; BAUMGARTNER, H.K; JAFFAR, M; VORONINA, S; SUTTON, R; PETERSEN, O.H; GERASIMENKO, O.V. Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? **Cell Death Differ**, v.14, n.7, Jul, p.1285-94. 2007.

CUMASHI, A; USHAKOVA, N.A; PREOBRAZHENSKAYA, M.E; D'INCECCO, A; PICCOLI, A; TOTANI, L; TINARI, N; MOROZEVICH, G.E; BERMAN, A.E; BILAN, M.I; USOV, A.I; USTYUZHANINA, N.E; GRACHEV, A.A; SANDERSON, C.J; KELLY, M; RABINOVICH, G.A; IACOBELLI, S; NIFANTIEV, N.E. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology** v.17, p.541-52, 2007.

CUNHA, F.Q; BOUKILI, M.A; MOTTA, J.I.B; VARGAFTIG, B.B; FERREIRA, S.H. Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. **Eur J Pharmacol.** V.6;238(1), p.47-52, 1993.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; DUGO, L.; SERRAINO, I.; CENTORRINO, T.; CICCOLO, A.; VAN DE LOO, F.A.J.; BRITTI, D.; CAPUTI, D.P.; THIEMERMANN, C. Inducible Nitric Oxide Synthase-Deficient Mice Exhibit Resistance to the Acute Pancreatitis Induced by Cerulein. **Shock**, v. 17, No. 5, p. 416-422, 2002.

DAWRA, R; SAH, R.P; DUDEJA, V; RISHI, L; TALUKDAR, R; GARG, P; SALUJA, A.K. Intra-acinar trypsinogen activation mediates early stages of pancreatic injury but not inflammation in mice with acute pancreatitis. **Gastroenterology.** v.141(6), p.2210-2217, 2011.

DE FILIPPIS, D; IUVONE, T; ESPOSITO, G; STEARDO, L; ARNOLD, G.H; PAUL, A.P; DE MAN JORIS, G; DE WINTER BENEDICTE, Y. Melatonin reverses lipopolysaccharide-induced gastro-intestinal motility disturbances through the inhibition of oxidative stress. **J Pineal Res.** v.44(1), p.45-51, 2008.

DE JONGE, W.J.; VAN DEN WIJINGARD, R.F.; THE FO TER BEEK, M.L.; BENNINK, R.J.; TYTGAT, G.; BUIJS, R.; REITSMA, P.; VAN DEVENTER, S.; BOECKXSTAENS, G. Postoperative ileum is maintained by intestinal immuneinfiltrates that activate inhibitory neural pathways in mice. **Gastroenterology.** v.125: p. 1137 – 1147, 2003.

DE WINTER, B.Y; VAN NASSAUW, L; DE MAN, J.G; DE JONGE, F; BREDENOORD, A.J; SEERDEN, T.C; HERMAN, A.G; TIMMERMANS, J.P; PELCKMANS, P.A. Role of oxidative stress in the pathogenesis of septic ileus in mice. **Neurogastroenterol Motil** v.17, p.251–261, 2005.

DEBAS, H; FAROOQ, O; GROSSMAN, M. Inhibition of gastric emptying is a physiological action of cholecystokinin. **Gastroenterol** v.68, p.1211–1217, 1975.

DENHAM, W; YANG, J; FINK, G; DENHAM, D; CARTER, G; WARD, K; NORMAN, J. Gene targeting demonstrates additive detrimental effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor during pancreatitis. **Gastroenterology** v.113, p.1741-1746, 1997.

DENNIS, J.W; LAFERTE, S. Tumor cell surface carbohydrate and the metastatic phenotype. **Cancer Metastasis Rev.** v. 5(3), p.185-204, 1987.

ELFAR, M.; GABER, L.W.; SABEK, O.; FISCHER, C.P.; GABER, A.O. The inflammatory cascade in acute pancreatitis: Relevance to clinical disease. **Surg. Clin. N. Am.** v. 87, p. 1325-1340, 2007.

FITZ, R.H. The symptomatology and diagnosis of diseases of the pancreas. **Proc N Y Path Soc.** v.43, p.1-26, 1898.

FLEXNER, S. The constituent of the bile causing pancreatitis and the effect of colloids on its action. **J. exp. Med.**, v.8, p. 167-75, 1906.

FOITZIK, T; HOTZ, H.G; EIBL, G; BUHR, H.J. Experimental models of acute pancreatitis: are they suitable for evaluating therapy? **Int J Colorectal Dis.** v.15(3), p.127-35, 2000.

FOLGH-PUY, E. Importance of the liver in systemic complications associated with acute pancreatitis: the role of Kupffer cells. **J Pathol.**, v. 211, p. 383-388, 2007.

FRANCO, J.; FERNANDES, R.; OLIVEIRA, M.; ALVES, A.D.; BRAGA, M.; SOARES, I.; CALHAU, P. Acute pancreatitis associated with varicella infection in an immunocompetent child. **J Paediatr Child Health.** v. 21, 2009.

FRITZ, S; HARTWIG, W; LEHMANN, R; WILL-SCHWEIGER, K; KOMMERELL, M; HACKERT T; SCHNEIDER, L; BÜCHLER, M.W; WERNER, J. Prophylactic antibiotic treatment is superior to therapy on-demand in experimental necrotising pancreatitis. **Crit Care.** v.;12(6), p.R141, 2008.

FROSSARD, J.L.; SALUJA, A.; BHAGAT, L. The role of intracellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis associated lung injury. **Gastroenterology**, v. 116, p. 694-701, 1999.

FROSSARD, J.L.; SALUJA, A.K.; MACH, N.; LEE, H.S.; BHAGAT, L.; HADENQUE, A.; RUBBIA-BRANDT, L.; DRANOFF, G.; STEER, M.L. *In vivo* evidence for the role of GM-CSF as a mediator in acute pancreatitis-associated lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. v.283(3), p.L541-8, 2002.

FROSSARD, J.L.; STEER, M.L.; PASTOR, C.M. Acute pancreatitis. **Lancet**, v. 371(9607), p. 143-152, 2008.

GENG, J.G., BEVILACQUA, M.P., MOORE, K.L., MCINTYRE, T.M., PRESCOTT, S.M., KIM, J.M., BLISS, G.A., ZIMMERMAN, G.A., MCEVER, R.P.. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. **Nature**, Oklahoma City, v. 343, n. 6260, p. 757-760, 1990.

GERASIMENKO, O.V.; GERASIMENKO, J.V. Mitochondrial function and malfunction in the pathophysiology of pancreatitis. **Pflugers Arch**. Jun 1, 2012.

GODFRAIND, T.; KABA, A. Blockade or reversal of the contraction induced by calcium and adrenaline in depolarized arterial smooth muscle. **Br J Pharmacol**. v.36(3), p. 549–560, 1969.

GOMEZ, J.M.; GERVANTES, G.L.; DE LA BARCA, A.M.C. Caerulein-induced pancreatitis in rats: histological and genetic expression changes from acute phase to recuperation. **World J Gastroenterol**. v. 12(25), p. 3999-4003, 2006.

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

GREWAL, H.P.; MOHEY EL DIN, A.; GABER, L.; KOTB, M.; GABER, A.O. Amelioration of the physiologic and biochemical changes of acute pancreatitis using an anti-TNF- α polyclonal antibody. **Am J Surg** v.167, p.214–218, 1994.

GUKOVSKAYA, A.S.; PANDOL, S.J. Cell death pathways in pancreatitis and pancreatic cancer. **Pancreatology**. v. 4, p. 567–586, 2004.

GUKOVSKAYA, A.S.; VAQUERO, E.; ZANINOVIC, V.; GORELICK, F.S.; LUSIS, A.J.; BRENNAN, M.L.; HOLLAND, S.; PANDOL, S.J. Neutrophils and NADPH oxidase mediate intrapancreatic trypsin activation in murine experimental acute pancreatitis. **Gastroenterology**. v.122, p. 974–984, 2002.

GULLO, L.; MIGLIORI, M.; OLÁH, A.; FARKAS, G.; LEVY, P.; ARVANITAKIS, C.; LANKISCH, P.; BEGER, H. Acute pancreatitis in five European countries: etiology and mortality. **Pancreas**. v. 24 (3), p. 223-227, 2002.

HABA, T.; SARNA, S.K. Regulation of gastroduodenal emptying of solids by gastropyloroduodenal contractions. **Am. J. Physiol.**, v. 264: p. G261 – G271, 1993.

HAFEZI-MOGHADAM, A.; THOMAS, K.L.; PROROCK, A.J.; HUO, Y.; LEY, K. L. Selectin Shedding Regulates Leukocyte Recruitment. **J Exp Med**, v.193, n.7, p. 863-872, 2001.

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

HAKOMORI, S. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. **Cancer Res**. v. 1;56(23, p.5309-18, 1996.

HALONEN, K.I; PETTILA, V; LEPPANIEMI, A.K; KEMPPAINEN, E.A; PUOLAKKAINEN, P.A; HAAPIAINEN, R.K. Multiple organ dysfunction associated with severe acute pancreatitis. **Crit Care Med**. v.30(6), p.1274-9, 2002.

HARTMAN, H; ABDULLA, A; AWLA, D; LINDKVIST, B; JEPPSSON, B; THORLACIUS, H; REGNER, S. P-selectin mediates neutrophil rolling and recruitment in acute pancreatitis. **Br J Surg**. v.99(2), p.246-55, 2012.

HE, M.; HORUK, R.; BHATIA, M. Treatment with BX471, a nonpeptide CCR1 antagonist, protects mice against acute pancreatitis-associated lung injury by modulating neutrophil recruitment. **Pancreas**., v. 34, p. 233-241, 2007.

HIROTA, M; NOZAWA, F; OKABE, A; SHIBATA, M; BEPPU, T; SHIMADA, S; EGAMI, H; YAMAGUCHI, Y; IKEI, S; OKAJIMA, T; OKAMOTO, K; OGAWA, M. Relationship between plasma cytokine concentration and multiple organ failure in patients with acute pancreatitis. **Pancreas**. v.21(2), p.141-6, 2000.

HIROTA, M.; OHMURAYA, M.; BABA, H. The role of trypsin, trypsin inhibitor, and trypsin receptor in the onset and aggravation of pancreatitis. **J Gastroenterol.**, v. 41(9), p. 832–836, 2006.

HUGHES, C.B.; EL-DIN, A.B.; KOTB, M.; GABER, L.W.; GABER, A.O. Calcium channel blockade inhibits release of TNF alpha and improves survival in a rat model of acute pancreatitis. **Pancreas**, v. 13(1), p. 22-28, 1996.

IRHIMEH, M.R.; FITTON, J.H.; LOWENTHAL, R.M. Pilot clinical study to evaluate the anticoagulant activity of fucoidan. **Blood Coagul. Fibrinolysis**. 20, 607–610, 2009.

JUCÁ, D.M. **Propriedades Farmacológicas Dos Monoterpenos A- E B-Pineno No Músculo Liso Gastrintestinal De Ratos: Efeito Miorrelaxante E Pró-Cinético**. 2007. 89 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Programa De Pós-Graduação Em Farmacologia, Universidade Federal Do Ceará, Fortaleza, 2007.

KALFF, J. C.; SCHRAUNT, W. H.; BILLIAR, T. R.; SIMMONS, R. L.; BAUER, A. J. Role of inducible nitric oxide synthase in postoperative intestinal smooth muscle dysfunction in rodents. **Gastroenterology**., v.118, p. 316–327, 2000.

KANG, G.H; YAN, B.C; CHO, G.S; KIM, W.K; LEE, C.H; CHO, J.H; KIM, M; KANG, I.J; WON, M.H; LEE, J.C. Neuroprotective effect of fucoidin on

lipopolysaccharide accelerated cerebral ischemic injury through inhibition of cytokine expression and neutrophil infiltration. **J Neurol Sci.** v. 15;318(1-2), p. 25-30, 2012.

KERRIGAN, D.D; READ, N.W, HOUGHTON, L.A; TALOR, M.E; JOHNSON, A.G. Disturbed gastroduodenal motility in patients with active and healed duodenal ulceration. **Gastroenterology.** v. 100, p. 892–900, 1991.

KIM, Y.J; VARKI, A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. **Glycoconj J.** v. 14(5), p. 569-76, 1997.

KIM, J.Y; KIM, K.H; LEE, J.A; NAMKUNG, W; SUN, A.Q; ANANTHANARAYANAN, M; SUCHY, F.J; SHIN, D.M; MUALLEM, S; LEE, M.G. Transporter-mediated bile acid uptake causes Ca²⁺-dependent cell death in rat pancreatic acinar cells. **Gastroenterology,** v.122, n.7, p.1941-53. 2002.

KIM, E.J; PARK, S.Y; LEE, J.Y; PARK, J.H. Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. **BMC Gastroenterol.** v. 22, p. 10:96, 2010.

KONIGSRAINER, I; TÜRCK, M.H; EISNER, F; MEILE, T; HOFFMANN, J; KÜPER, M; ZIEKER, D; GLATZLE, J. The gut is not only the target but a source of inflammatory mediators inhibiting gastrointestinal motility during sepsis. **Cell Physiol Biochem.** v. 28(4), p. 753-60, 2011.

KRUGER, B.; ALBRECHT, E.; LERCH, M.M. The role of intracellular calcium signaling in premature protease activation and the onset of pancreatitis. **Am J Pathol,** v.157, n.1, Jul, p.43-50. 2000.

KYLANPAA, L; RAKONCZAY, Z. JR; O'REILLY, D.A. The clinical course of acute pancreatitis and the inflammatory mediators that drive it. **Int J Inflam.** 2012:360685, 2012.

LANGER, H.F.; CHAVAKIS, T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. **J. Cell. Mol. Med.,** v.13, n.7, p.1211-1220, 2009.

LAUKKARINEN, J.M; VAN ACKER, G.J; WEISS, E.R; STEER, M.L; PERIDES, G. A mouse model of acute biliary pancreatitis induced by retrograde pancreatic duct infusion of Na-taurocholate. **Gut.** v. 56(11), p. 1590-8, 2007.

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

LEUNG, P.S; CHAN, Y.C. Role of oxidative stress in pancreatic inflammation. **Antioxid Redox Signal.** v. 11, p. 135–66, 2009.

LEY, K; LINNEMANN, G; MEINEN, M; STOOLMAN, L.M; GAEHTGENS, P. Fucoidin, but not yeast polyphosphomannan PPME, inhibits leukocyte rolling in venules of the rat mesentery. **Blood.** v. 81, p. 177–85, 1993.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M.I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature**, Charlottesville-Virginia, v.7, p.678-689, 2007.

LIN, Z; LIU, Y; ZHENG, Q; HU, Q. Increased proportion of nitric oxide synthase immunoreactive neurons in rat ileal myenteric ganglia after severe acute pancreatitis. **BMC Gastroenterol.** v. 23, p. 111:127, 2011.

LOMBARDI, B; ESTES, L.W; LONGNECKER, D.S. Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with a choline-deficient diet. **Am J Pathol.** v. 79, p. 465-480, 1975.

LOVE, B.L.; KEHR, H.; OLIN, J.L. Hypertriglyceridaemia-induced acute pancreatitis due to patient non-compliance. **J Clin Pharm Ther.** v. 34 (3), p. 363-367, 2009.

MALLEO, G; MAZZON, E; GENOVESE, T; DI PAOLA, R; MUIA, C; CENTORRINO, T; SIRIWARDENA, A.K; CUZZOCREA, S. Etanercept attenuates the development of cerulein-induced acute pancreatitis in mice. A comparison with TNF- α Genetic deletion. **Shock** v. 27, p. 542-551, 2007.

MALLEO, G.; MAZZON, E.; GENOVESE, T.; DI PAOLA, R.; MUIA, C.; CRISAFULLI, C.; SIRIWARDENA, A.K.; CUZZOCREA, S. Effects of thalidomide in a mouse model of cerulein-induced acute pancreatitis. **Shock.** v. 29(1), p. 89-97, 2008.

MARENINOVA, O.A; SUNG, K.F; HONG, P; LUGEA, A; PANDOL, S.J; GUKOVSKY, I; GUKOVSKAYA, A.S. Cell death in pancreatitis: caspases protect from necrotizing pancreatitis. **J Biol Chem.** v. 281, p. 3370-3381, 2006.

MCEVER, R.P; MOORE, K.L; CUMMINGS, R.D. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. **J Biol Chem.** v. 12, p. 270(19):11025-8, 1995.

MILLER, M. S.; GALLIGAN, J. J.; BURKS, T. F. Accurate measurement of intestinal transit in the rat. **J. Pharmacol. Methods.**, v. 6(3), p. 211-217, 1981.

MOFLEH, I.A. Severe acute pancreatitis: pathogenetic aspects and prognostic factors. **World J Gastroenterol.** v. 7;14(5), p. 675-84, 2008.

MOREELS, T. G.; DE MAN, J. G.; BOGERS, J.; DE WINTER, B. Y.; VROLIX, G.; HERMAN, A. G.; VAN MARCK, E. A.; PELCKMANS, P. A. Effect *Shistosoma mansoni*-induced granulomatous inflammation on murine gastrointestinal motility. **Am. J. Physiol.**, v. 280, p. G1030-G1042, 2001.

MOSSMANN, D. F. **Efeitos do Cloreto de Gadolínio no Tratamento da Pancreatite Aguda Experimental Induzida por Tauracolato de Sódio em Ratos.** 2009. 127f Dissertação (Mestrado em Ciências Cirúrgicas) Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas. Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2009.

MUILI, K.A; WANG, D; ORABI, A.I; SARWAR, S; LUO, Y; JAVED, T.A; EISSES, J.F; MAHMOOD, S.M; JIN, S; SINGH, V.P; ANANTHANARAVANAN, M; PERIDES, G; WILLIAMS, J.A; MOLKENTIN, J.D; HUSAIN, S.Z. Bile acids induce pancreatic acinar cell injury and pancreatitis by activating calcineurin. **J Biol Chem.** v. 4;288(1), p. 570-80, 2013.

NAGAOKA, M; SHIBATA, H; KIMURA-TAKAGI, I; HASHIMOTO, S; AIYAMA, R; UEYAMA, S; YOKOKURA, T. Anti-ulcer effects and biological activities of polysaccharides from marine algae. **Biofactors.** v. 12(1-4), p. 267-74, 2000.

NEOPTOLEMOS, J.P. **The role of endoscopic shincterotomy and surgery in the gallstone pancreatitis.** In: Zentler-Munro, P.L., ed. *Advances in Pancreatitis* – Duphar Laboratories Limited, p. 33-60, 1988.

NEVES, P.L. **Inflamação Na Doença Renal Crónica.** 2008. 107f Tese (Doutorado) Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina de Lisboa, Lisboa, 2008.

NORMAN, J.G.; FINK, G.W.; FRANZ, M.G. Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. **Arh Surg,** v. 130, p. 966-970, 1995.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.** v. 95, p. 351- 358, 1979.

OKADA, S; SAITO, M; KINOSHITA, Y; SATOH, I; KAZUYAMA, E; HAYASHI, A; SATOH, K; KANZAKI, S. Characterization of the ileal muscarinic receptor system in 70-week-old type II Goto-Kakizaki diabetic rats; effects of cyclohexenonic long-chain fatty alcohol. **Eur J Pharmacol.** v. 2;611(1-3), p. 72-6, 2009.

PANDOL, S.J; SALUJA, A.K; IMRIE, C.W; BANKS, P.A. Acute pancreatitis: bench to the bedside. **Gastroenterology.** v. 133(3), p. 1056-1056, 2007.

PANDOL, S.J. **The Exocrine Pancreas. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease.** San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.

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

PATEL, K.D.; CUVELEIER, S.L.; WIEHLER, S. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. **Seminar in Immunology,** v.14, p.73-81, 2002.

PATERNITI, I; MAZZON, E; RICCARDI, L; GALUPPO, M; IMPELLIZZERI, D; ESPOSITO, E; BRAMANTI, P; CAPPELLANI, A; CUZZOCREA, S. Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonist GW0742 ameliorates cerulein- and taurocholate-induced acute pancreatitis in mice. **Surgery.** v. 152(1), p. 90-106, 2012.

PERIDES, G; VAN ACKER, G.J; LAUKKARINEN, J.M; STEER, M.L. Experimental acute biliary pancreatitis induced by retrograde infusion of bile acids into the mouse pancreatic duct. **Nat Protoc,** v.5, n.2, p.335-41. 2010.

PINTO, L.G; CUNHA, T.M; VIEIRA, S.M; LEMOS, H.P; VERRI, W.A JR; CUNHA, F.Q; FERREIRA, S.H. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. **Pain**. v. 148(2), p. 247-56, 2010.

POMIN, V.; MOURÃO, P. A. S. Structure, biology, evolution and medical importance of sulphated fucans and galactans. **Glycobiology**, v. 18, p. 1016-1027, 2008.

PRYOR, W; SQUADRITO, G: The chemistry of peroxyxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. **Am J Physiol** v. 268, p. L699–L722, 1995.

RAGHAVENDRAN, H.R; SRINIVASAN, P; REKHA, S. Immunomodulatory activity of fucoidan against aspirin-induced gastric mucosal damage in rats. **Int Immunopharmacol**. v. 11(2), p.157-63, 2011.

RAINER, T.H. L-selectin in health and disease. **Resuscitation**, v.52, p.127-141, 2002.

RANSON, J.H.C. Acute pancreatitis. Em: STAMFORD, C.T.; ZINNER, M.J. – **Maingot's abdominal operation**, v. 10 (2), 1997.

RARATY, M; WARD, J; ERDEMLI, G; VAILLANT, C; NEOPTOLEMOS, J.P; SUTTON, R; PETERSEN, O.H. Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, n.24, p.13126-31. 2000.

RARATY, M.G; MURPHY, J.A; MCLOUGHLIN, E; SMITH, D; CRIDDLE, D; SUTTON, R. Mechanisms of acinar cell injury in acute pancreatitis. **Scand J Surg**. v. 94(2), p. 89-96, 2005.

RIOU, D.; COLLIEC-JOUAULT, S.; PINGZON DU SEL, D.; BOSCH, S.; SIAVOSHIAN, S.; LE BERT, V.; TOMASONI, C.; SINQUIN, C.; DURAND, P.; ROUSSAKIS, C. Antitumor and Antiproliferative Effects of a Fucan Extracted from *Ascophyllum Nodosum* against a Non-Small-Cell Bronchopulmonary Carcinoma Line. **Anticancer Res**. v. 16, p. 1213–1218; 1996.

ROSA, I.; PAIS, M.J.; FÁTIMA, C.; QUEIROZ, A. PANCREATITE AGUDA: Atualização e proposta de protocolo de abordagem. **Acta Méd Port**. v.17, p. 317-324; 2004.

RUSSELL, F.A; FERNANDES, E.S; COURADE, J.P; KEEBLE, J.E; BRAIN, S.D. Tumour necrosis factor alpha mediates transient receptor potential vanilloid 1-dependent bilateral thermal hyperalgesia with distinct peripheral roles of interleukin-1beta, protein kinase C and cyclooxygenase-2 signalling. **Pain**. v. 142(3), p. 264-74, 2009.

SALUJA, A.K; LERCH, M.M; PHILLIPS, P.A; DUDEJA, V. Why does pancreatic overstimulation cause pancreatitis? **Annu Rev Physiol**. v. 69, p. 249-69, 2007.

SARR, M.G.; NAGORNEY, D.M.; MUCHA, Jr. P.; FARNELL, M.B.; JOHNSON, C.D. Acute necrotizing pancreatitis: management by planned, staged pancreatic

necrosectomy/debridement and delayed primary wound closure over drains. **Br J Surg.**, v. 78, p. 576-581, 1991.

SCHEMANN, M.; ROHN, M.; MICHEL, K. Motor control of the stomach. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**, v.12, n. 1, p.41-51, 2008.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutical potential. *Int. Immunopharmacol.*, v. 6, p. 317-333, 2006.

SEERDEN, T. C.; DE WINTER, B. Y.; VAN DEN BOSSCHE, R. M.; HERMAN, A. G.; PELCKMANS, P. A.; DE MAN, J. G. Regional differences in gastrointestinal motility disturbances during acute necrotising pancreatitis. **Neurogastroenterol Motil.** v. 17, p. 671–679, 2005.

SENDER, M; DUMMER, A; WEISS, F.U; KRÜGER, B; WARTMANN, T; SCHARFFETTER-KOCHANEK, K; VAN ROOIJEN, N; MALLA, S.R; AGHDASSI, A; HALANGK, W; LERCH, M.M; MAYERLE, J. Tumour necrosis factor α secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice. **Gut.** v. 62(3), p. 430-9, 2012.

SENNINGER, N. Bile-induced pancreatitis. **Eur Surg Res** v. 24 Suppl 1, p. 68-73, 1992.

SHIMAOKA, M; IKEDA, M; IIDA, T; TAENAKA, N; YOSHIYA, I; HONDA, T. Fucoidin, a potent inhibitor of leukocyte rolling, prevents neutrophil influx into phorbol-ester-induced inflammatory sites in rabbit lungs. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 153, p. 307–311, 1996.

SMALLEY, D.M.; LEY, K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. **Journal of Cellular and Molecular Medicine.** v.9, n. 2, p. 255-266, 2005.

SMITH, E; MCGETTRICK, H.M; STONE, M.A; SHAW, J.S; MIDDLETON, J; NASH, G.B; BUCKLEY, C.D; ED RAINGER, G. Duffy antigen receptor for chemokines and CXCL5 are essential for the recruitment of neutrophils in a multicellular model of rheumatoid arthritis synovium. **Arthritis Rheum.** v. 58(7), p. 1968-73, 2008.

SOARES, P.M; MOTA, J.M; GOMES, A.S; OLIVEIRA, R.B; ASSREUY, A.M; BRITO, G.A; SANTOS, A.A; RIBEIRO, R.A; SOUZA, M.H. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemother Pharmacol.** v. 63(1), p. 91-8, 2008.

SOUZA, M.H; TRONCON, L.E; CUNHA, F.Q; OLIVEIRA, R.B. Decreased gastric tone and delayed gastric emptying precede neutrophil infiltration and mucosal lesion formation in indomethacin-induced gastric damage in rats. **Braz J Med Biol Res.** v. 36(10), p. 1383-90, 2003.

SOUZA, M.H; LEMOS, H.P; OLIVEIRA, R.B; CUNHA, F.Q. Gastric damage and granulocyte infiltration induced by indomethacin in tumour necrosis factor receptor

1 (TNF-R1) or inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficient mice. **Gut**. v. 53(6), p. 791-6, 2004.

SOUZA, M.H; MOTA, J.M; OLIVEIRA, R.B; CUNHA, F.Q. Gastric damage induced by different doses of indomethacin in rats is variably affected by inhibiting iNOS or leukocyte infiltration. **Inflamm Res**. v. 57(1), p. 28-33, 2008.

STORR, M; SATTLER, D; HAHN, A; SCHUSDZIARRA, V; ALLESCHER, HD. Endogenous CCK depresses contractile activity within the ascending myenteric reflex pathway of rat ileum. **Neuropharmacology**. v. 44(4), p. 524-32, 2003.

SU, F; HUANG, H; AKIEDA, K; OCCHIPINTI, G; DONADELLO, K; PIAGNERELLI, M; DE BACKER, D; VINCENT, J.L. Effects of a selective iNOS inhibitor versus norepinephrine in the treatment of septic shock. **Shock**. v. 34(3), p. 243-9, 2010.

SUNG, K.F; ODINOKOVA, I.V; MARENINOVA, O.A; RAKONCZAY, Z. JR; HEGYI, P; PANDOL, S.J; GUKOVSKY, I; GUKOVSKAYA, A.S. Prosurvival Bcl-2 proteins stabilize pancreatic mitochondria and protect against necrosis in experimental pancreatitis. **Exp Cell Res**. v. 1;315(11), p. 1975-89, 2009.

TANAKA, N; MURATA, A; UDA, K; TODA, H; KATO, T; HAYASHIDA, H; MATSUURA, N; MORI, T: Interleukin-1 receptor antagonist modifies the changes in vital organs induced by acute necrotizing pancreatitis in a rat experimental model. **Crit Care Med** v. 23, p. 901–908, 1995.

TANAKA, K; ITO, M; KODAMA, M; TOMITA, M; KIMURA, S; HOYANO, M; MITSUMA, W; HIRONO, S; HANAWA, H; AIZAWA, Y. Sulfated polysaccharide fucoidan ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. **J Cardiovasc Pharmacol Ther**. v. 16(1),p. 79-86, 2011.

TANNE, D; HAIM, M; BOYKO, V; GOLDBOURT, U; RESHEF, T; MATETZKY, S; ADLER, Y; MEKORI, Y.A; BEHAR, S. Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 and Risk of Future Ischemic Stroke. A Nested Case-Control Study From the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Study Cohort. **Stroke**. v.; 33, p. 2182-2186, 2002.

TATTERSALL, S.J.N.; APTE, M.V.; WILSON, J.S. A fire inside: current concepts in chronic pancreatitis. **Internal Medicine Journal**. v. 38, p. 592-598, 2008.

TEIXEIRA, M.M.; HELLEWELL, P.G. The effect of the selectin binding polysaccharide fucoidin on eosinophil recruitment *in vivo*. **Br. J. Pharmacol**. v. 120, p. 1059-1066, 1997.

TOKITA,Y.; NAKAJIMA,K.; MOCHIDA, H.; IHA, M.; NAGAMINE¹, T. Development of a Fucoidan-Specific Antibody and Measurement of Fucoidan in Serum and Urine by Sandwich ELISA. **Biosci. Biotechnol. Biochem**. 74 (2), 350–357, 2010.

TOOULI, J.; BROOKE-SMITH, M.; BASSI, C. Guidelines for the management of acute pancreatitis. **J Gastroenterol Hepatol**. v. 17, p. 15-39, 2002.

TRIVINO, T.; FILHO, G.J.L.; TORREZ, F.R.A. Pancreatite aguda: o que mudou? **GED.**, v. 21 (2), 2002.

TSUCHIYA, Y; NOZU, T; KUMEI, S; OHHIRA, M; OKUMURA, T. IL-1 receptor antagonist blocks the lipopolysaccharide-induced inhibition of gastric motility in freely moving conscious rats. **Dig Dis Sci.** v. 57(10), p. 2555-61, 2012.

TZIANABOS, A. O. Polysaccharide Immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, p. 523-533, 2000.

UHL, W.; ISENMANN, R.; CURTI, G.; VOGEL, R.; BEGER, H.G.; BUCHLER, M.W. Influence of etiology on the course and outcome of acute pancreatitis. **Pancreas.** 13: 335–43; 1996.

UHLMANN, D.; LAUER, H.; SERR, F.; LUDWIG, S.; TANNAPFEL, A.; FIEDLER, M. Pathophysiological role of platelets in acute experimental pancreatitis: influence of endothelin A receptor blockade. **Cell Tissue Res**, v. 327, p. 485-492, 2007.

VAN WESTERLOO, D.J.; MARIS, N.A.; BRUNO, M.J.; VAN DER POLL, T. Caerulein induced pancreatitis. **Gut**, v. 52, p. 452–453, 2003.

VEGE, S.; CHARI, S.T. Pathogenesis of acute pancreatitis. Uptodate Online; (2012). Available at: http://www.uptodate.com/contents/search?search=Pathogenesis+of+acute+pancreatitis&sp=0&searchType=PLAIN_TEXT&source=USER_INPUT&searchControl=TOP_PULLDOWN&searchOffset=.

VERMILLION, D.L.; COLLINS, S.M. Increased responsiveness of jejunal longitudinal muscle in Trichinella-infected rats. **Am. J. Physiol.**, v. 264: p. G124 – G129, 1988.

VLIEGENTHART, J. F. G. Carbohydrate based vaccines. **FEBS Lett.**, v. 580, p. 2945-2950, 2006.

VORONINA, S; LONGBOTTOM, R; SUTTON, R; PETERSEN, O.H; TEPIKIN, A. Bile acids induce calcium signals in mouse pancreatic acinar cells: implications for bile-induced pancreatic pathology. **J Physiol**, v.540, n.Pt 1, Apr 1, p.49-55. 2002.

WAGNER, J.G; ROTH, R.A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacol Rev.** v. 52(3), p. 349-74, 2000.

WANG, Y.L.; JIA, Y.J.; WANG, X.S.; JIANG, M.N.; ZHAO, J.X. Experimental study on treatment of rat severe acute pancreatitis with Gardenia Jasminoides Ellis Extract. **Chin J Surg Integr Tradit West Med.**, v. 9, p.119-121, 2003.

WANG, H; LUO, W; WANG, J; GUO, C; WANG, X; WOLFFE, S.L; BODARY, P.F; EITZMAN, D.T. Obesity-induced endothelial dysfunction is prevented by deficiency of P-selectin glycoprotein ligand-1. **Diabetes.** v. 61(12), p. 3219-27, 2012.

WASLE, B.; EDWARDSON, J.M.; The regulation of exocytosis in the pancreatic acinar cell. **Cell Signal**, v. 14 (3), p.191-197, 2002.

WHITCOMB, D.C.; ULRICH, C.D. Hereditary pancreatitis: new insights, new directions. In Tytgat, GNJ (ed)- Ballière's **Clinical Gastroenterology**, v.113, p. 253-63, 1999.

WILDI, S; KLEEFF, J; MAYERLE, J; ZIMMERMANN, A; BÖTTINGER, E;P; WAKEFIELD, L; BÜCHLER, M;W; FRIESS H; KORC M. Suppression of transforming growth factor beta signalling aborts caerulein induced pancreatitis and eliminates restricted stimulation at high caerulein concentrations. **Gut**. v. 56(5), p. 685-92, 2007.

WILLIAMS, J.A. Intracellular signaling mechanisms activated by cholecystokininregulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells. **Annu Rev Physiol**. v. 63, p. 77-79, 2001.

YAMASAKI-MIYAMOTO, Y; YAMASAKI, M; TACHIBANA, H; YAMADA, K. Fucoidan induces apoptosis through activation of caspase-8 on human breast cancer MCF-7 cells. **J Agric Food Chem**. v. 57(18), p. 8677–8682, 2009.

ZANINOVIC, V; GUKOVSKAYA, A.S; GUKOVSKY, I; MOURIA, M; PANDOL, S.J. Cerulein upregulates ICAM-1 in pancreatic acinar cells, which mediates neutrophil adhesion to these cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. v. 279(4), p. G666-76, 2000.

ZHANG, X.W; LIU, Q; THORLACIUS, H. Inhibition of selectin function and leukocyte rolling protects against dextran sodium sulfate-induced murine colitis. **Scand J Gastroenterol**. v. 36(3), p. 270-5, 2001.

ZHANG, H.; ZHI, L.; MOORE, P.K.; BHATIA, M. The role of hydrogen sulfide in cecal ligation and puncture induced sepsis in the mouse. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**., v. 290, p. 1193–1201, 2006.

ZHOU, M.T; CHEN, C.S; CHEN, B.C; ZHANG, Q.Y; ANDERSSON, R. Acute lung injury and ARDS in acute pancreatitis: mechanisms and potential intervention. **World J Gastroenterol**. v. 7;16(17), p. 2094-9, 2010.

ZHOU, H; GAO, J; WU, W; LIU, L; WEI, L; ZOU, D; LI, Z. Octreotide ameliorates intestinal dysmotility by interstitial cells of Cajal protection in a rat acute necrotizing pancreatitis model. **Pancreas**. v. 40(8), p. 1226-33, 2011.

ZHOU, H; GAO, J; ZOU, D; WU, W; LI, Z. Effect of octreotide on enteric motor neurons in experimental acute necrotizing pancreatitis. **PLoS One**. v. 7(12):e52163, 2012.

APÊNDICE

Artigo Submetido (no prelo)

Pancreas

Protective effects of Fucoidan, a P- and L-selectin inhibitor, in murine acute pancreatitis --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PANCREAS 12667
Full Title:	Protective effects of Fucoidan, a P- and L-selectin inhibitor, in murine acute pancreatitis
Short Title:	Fucoidan ameliorates Acute Pancreatitis in Mice.
Article Type:	Full Manuscript
Keywords:	Acute pancreatitis; fucoidan; L-selectin; P-selectin; neutrophil.
Corresponding Author:	Pedro Soares, PhD Federal University of Ceara Fortaleza, BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Federal University of Ceara
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Ana Carvalho, MSc
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Ana Carvalho, MSc Rhamon Sousa Álvaro Franco José Costa Luara Neves Ronaldo Ribeiro, MD, PhD Robert Sutton, DPhil, FRCS David Criddle, PhD PEDRO SOARES, PhD Marcellus Souza, MD, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	<p>Aims: To investigate the potential protective effects of fucoidan, an L and P-selectin modulator, in two murine models of acute pancreatitis (AP). Methods: AP was induced in mice either by the retrograde infusion of taurolithocholic acid (3.0%) (TLCS-AP) into the pancreatic duct or by intraperitoneal injections of cerulein (50 µg/kg/h) (CER-AP). The experimental groups received fucoidan (25 mg/kg, i.v.) before pancreatitis induction whilst control groups received only saline. After 24 hours, serum amylase, lipase, IL-1β, TNF-alpha and nitrite were measured. In addition, MPO activity (lung and pancreas) and histological assessment (pancreas) were determined. Results: Serum amylase, lipase, nitrite, TNF-alpha and IL-1β, pancreatic and lung MPO, were increased in both TLCS- and CER-AP compared with respective control groups. Fucoidan significantly decreased the augmented levels of amylase, lipase, pancreatic and lung MPO, TNF-alpha, IL-1β and nitrite in both AP models. Pancreas histological changes observed in both AP models were significantly attenuated by fucoidan. Conclusion: Fucoidan reduced the severity of AP in mice by decreasing neutrophil infiltration and systemic inflammation, suggesting that modulation of selectins may constitute a promising therapeutic approach.</p>

Protective effects of Fucoidan, a P- and L-selectin inhibitor, in murine acute pancreatitis

Ana C. S. Carvalho, MSc^a; Rhamon B. Sousa^a; Álvaro Xavier Franco^b; José Victor Gomes Costa^b; Luara Manuela Neves^b; Ronaldo A. Ribeiro, MD, PhD^a; Robert Sutton, DPhil, FRCS^c; David N. Criddle, PhD^{c, d}; Pedro M. G. Soares, PhD^b; Marcellus H. L. P. de Souza MD, PhD^a

a- Institute of Biomedicine of Brazilian Semi-Arid (INCT-IBISAB), Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Federal University of Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo, 1315, CEP: 60430-270, Fortaleza- CE, Brazil.

b- Institute of Biomedicine of Brazilian Semi-Arid (INCT-IBISAB), Department of Morphology, School of Medicine, Federal University of Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo, 1315, CEP: 60430-270, Fortaleza- CE, Brazil.

c- NIHR Pancreas Biomedical Research Unit, University of Liverpool, Liverpool L69 3BX, UK

d- Department of Cellular & Molecular Physiology, Institute of Translational Medicine, University of Liverpool, Liverpool L69 3BX, UK

Running title: Fucoidan ameliorates Acute Pancreatitis in Mice.

Correspondence:

Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza, MD, PhD

Centro de Biomedicina, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Address for reprint requests: Rua Cel. Nunes de Melo, 1315, Rodolfo Teófilo, Fortaleza-CE, Brazil, CEP: 60.430-270, Phone/Fax: +55-85-33668588.

e-mail: souzamar@ufc.br

Financial support: CAPES, CNPq- Brazil; The Royal Society-UK.

The authors have no conflicts of interest or funding to disclose.

ABSTRACT

Aims: To investigate the potential protective effects of fucoidan, an L and P-selectin modulator, in two murine models of acute pancreatitis (AP). **Methods:** AP was induced in mice either by the retrograde infusion of taurochenodeoxycholic acid (3.0%) (TLCS-AP) into the pancreatic duct or by intraperitoneal injections of cerulein (50 µg/kg/h) (CER-AP). The experimental groups received fucoidan (25 mg/kg, i.v.) before pancreatitis induction whilst control groups received only saline. After 24 hours, serum amylase, lipase, IL-1 β , TNF- α and nitrite were measured. In addition, MPO activity (lung and pancreas) and histological assessment (pancreas) were determined. **Results:** Serum amylase, lipase, nitrite, TNF- α and IL-1 β , pancreatic and lung MPO, were increased in both TLCS- and CER-AP compared with respective control groups. Fucoidan significantly decreased the augmented levels of amylase, lipase, pancreatic and lung MPO, TNF- α , IL-1 β and nitrite in both AP models. Pancreas histological changes observed in both AP models were significantly attenuated by fucoidan. **Conclusion:** Fucoidan reduced the severity of AP in mice by decreasing neutrophil infiltration and systemic inflammation, suggesting that modulation of selectins may constitute a promising therapeutic approach.

Key Words: Acute pancreatitis, fucoidan, L-selectin, P-selectin, neutrophil

INTRODUCTION

Acute pancreatitis (AP) is a systemic inflammatory disease with wide clinical expression and often associated with significant morbidity and mortality [1]. Pancreatic inflammation is characterized by premature activation of digestive proteases, acinar cell necrosis, interstitial oedema and infiltration of inflammatory cells [2]. Evidence suggests that leukocyte infiltration is a crucial feature of both local and systemic manifestations of severe AP [3, 4]. The important role of the neutrophil in mediating trypsinogen activation in AP has been shown [5], with several studies indicating that targeting specific adhesion molecules, such as ICAM-1 and LFA-1, causes neutrophil depletion and reduction of tissue damage in severe AP [6, 7].

Among the molecules involved in neutrophil rolling on endothelial cells, the selectins, including L-selectin (expressed by most leukocytes) and E- and P-selectins (expressed by inflamed endothelial cells), may play significant roles [8]. Although selectins have been reported to regulate inflammation in a wide range of diseases, their role in pancreatic infiltration of leukocytes has not yet been fully elucidated.

Natural products have been increasingly exploited as a source of therapeutic compounds for a variety of diseases and interest has recently focused on the properties of sulfated fucans. Fucoidan is a sulfated polysaccharide extracted from brown seaweeds that possesses anti-inflammatory properties. [9, 10]. Fucoidan has been shown to act as a ligand for either L- or P-selectins, thereby inhibiting leukocyte rolling [10]. Studies by our group have shown that fucoidan prevented gastric damage and the increase in gastric MPO activity in gastropathy induced by indomethacin and reduced tissue injury and inflammation in a mouse model of toxin-A-induced enteritis [11, 12]. However, as yet no studies concerning the potential effects of fucoidan in AP have been published.

Considering the recognized importance of neutrophils in AP and the modulation of their function by selectins, we hypothesized that fucoidan might exert protective effects in AP disease models. We show that fucoidan treatment reduced tissue damage and inflammation in two murine models of AP, suggesting the potential of selectin modulation for the treatment of this disease.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Swiss mice (weight, 25-30 g) obtained from the Central Animal House of our University were used in these studies. The animals were housed in a controlled environment. Food and water were available *ad libitum*. The study was approved by the Institutional Committee on Care and Use of Animals for experimentation (No. 26/10).

Experimental design

The actions of fucoidan were evaluated in two models of murine AP. In cerulein-induced AP (CER-AP) mice received 12 intraperitoneal (i.p.) injections of cerulein (50 µg/kg body wt) in saline solution into the left lower abdomen [13]. Control mice were administered with comparable injections of saline. One group of animals received fucoidan (25 mg/kg, i.v.) thirty minutes before the first cerulein injection and immediately after last cerulein treatment.

For tauro lithocholic acid sulphate-induced AP (TLCS-AP), mice were assigned to saline, sham, TLC-S and fucoidan + TLC-S groups. TLC-S (50 µl, 3%), was retrogradely infused into the mouse pancreatic duct of TLC-S and TLC-S+Fucoidan

groups as described previously [14]. In the saline group, the procedures were performed identically, except for the injection of TLC-S, which was replaced with saline solution. Sham-operated animals served as a control. Fucoidan (25 mg/kg i.v.) was administered thirty minutes before cannulation of the pancreatic duct and administration of TLC-S to the TLC-S+Fucoidan group.

Twenty-four hours after the induction of AP, mice were anaesthetized, blood samples were drawn, the animals exsanguinated, and the pancreas and lung were quickly removed and frozen at -70°C until use. Portions of pancreas were also fixed in formaldehyde for histological examination.

Serum amylase and lipase levels determination

The serum amylase and lipase levels were measured by a colorimetric method using a commercial kit for amylase (Labtest, Minas Gerais, Brazil) and lipase (Bioclin, Minas Gerais). The values were expressed as units of enzyme U/l.

Pancreas histology

Samples of pancreatic tissue were fixed in 10% buffered formalin solution, embedded in paraffin using standard methods, cut into 5 µm sections, stained with hematoxylin-eosin, and then assessed under light microscopy and examined blinded by a morphologist for grading the histological alterations. Pancreatic oedema, inflammatory cell infiltrate and acinar necrosis were graded with scores ranging from 0 to 3 as described by Wildi *et al* [15].

Myeloperoxidase assay

MPO activity, a marker for neutrophils in inflamed tissue, was measured in mice pancreas and lung using a modified version from Bradley *et al* [16]. Briefly, samples were homogenized in hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) buffer (50 mg of tissue/ml). The supernatant was collected and assayed by measuring the change in absorbance at 450 nm using a reading solution (5 mg O-dianisidine; 15 μ l of 1% H₂O₂; 3 ml phosphate buffer; 27 ml H₂O) and values were expressed as units of MPO per mg of tissue.

Determination of serum nitrite levels

The production of NO was determined indirectly by measuring the nitrite levels based on the Griess reaction [17]. Briefly, 80 μ l of each plasma sample were incubated with 80 μ l of the Griess reagent (1% sulfanilamide in 1% H₃PO₄/0.1%N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride/1% H₃PO₄/distilled water, 1:1:1:1) at room temperature for 10 min. The absorbance was measured at 560 nm in a microplate reader, and nitrite concentration was determined from a standard nitrite curve generated using NaNO₂.

Measurement of cytokines

TNF- α and IL-1 β concentrations were determined by enzyme-linked immunosorbance assay (ELISA), as described previously [18]. Briefly, microtiter plates were coated overnight at 4°C with antibody against mice TNF- α and IL-1 β . After blocking the plates, the plasma samples and standard at various dilutions were added in duplicate and incubated at 4°C for 24 h. The plates were washed three times with buffer. After washing the plates, biotinylated sheep polyclonal anti-TNF- α

or anti-IL-1 β was added to the wells. After further incubation at room temperature for 1 h, the plates were washed and 50 μ l of avidin-HRP diluted 1:5,000 was added. The colour reagent o-phenylenediamine (OPD; 50 μ l) was added 15 min later, and the plates were incubated in the dark at 37°C for 15–20 min. The enzyme reaction was stopped with H₂SO₄, and the absorbance was measured at 490 nm. The cytokine levels were calculated from the standard curve and expressed as pg/mL.

Drugs and reagents

Fucoidan from *Fucus vesiculosus*, cerulean and tauroolithocholic acid were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.). The drugs were diluted in sterile saline. All other chemicals and reagents were of the highest commercial grade available.

Statistical analysis

The data are presented as means \pm standard error of the mean (SEM) or as median values and range, where appropriate. Univariate analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls test was used to compare means, and the Kruskal–Wallis followed by Dunn's test was used to compare medians. Differences were considered to be significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Effects of fucoidan on biochemical parameters of AP

Serum amylase and lipase levels were increased in both AP models (Fig. 1). Pretreatment with fucoidan significantly reduced amylase ratios by 39% and 92%, in CER-AP and TLCS-AP, respectively. Fucoidan also reduced the levels of lipase by 37% and 92% in in CER-AP and TLCS-AP, respectively (Fig. 1).

Effects of fucoidan on histological damage in AP models

Histological examination of saline controls for both models showed normal architecture and absence of pancreas tissue injury (Fig. 2A and Table 1). In contrast, pancreatic sections from CER-AP and TLCS-AP revealed extensive tissue damage characterized by edema, inflammatory cell infiltrates and acinar cell necrosis (Fig. 2B, E and Table 1). Pretreatment with fucoidan reduced the tissue damage in both models, as evidenced by lower overall histological scores (Fig. 2C, F Table 1). However, whereas fucoidan significantly reduced each individual parameter (edema, inflammatory cell infiltration and acinar cell necrosis) in TLCS-AP, the inhibitory action of the fucan only achieved significance in the overall score in the CER-AP model (Fig. 2 and Table 1).

Effects of fucoidan on pancreatic and lung MPO activity in AP

In both models of AP an increase in pancreatic MPO activity compared with the control group was observed (Fig. 3A, B). Fucoidan markedly reduced pancreas MPO activity in CER-AP (92%) and TLCS-AP (93%) (Fig. 3A, B). Lung MPO activity was elevated in mice in both AP models. Fucoidan also significantly reduced the

pancreatitis-evoked increase in MPO lung activity by 98% and 99%, respectively, in CER-AP and TLCS-AP (Fig. 3C, D).

Effects of fucoidan on serum TNF- α , IL-1 β and nitrite levels in AP models

The biochemical markers serum TNF- α , IL-1 β and nitrite were all elevated in both AP models (Table 2). In CER-AP fucoidan treatment reduced TNF- α and IL-1 β levels by 97% and 83%, respectively (Table 2), whilst in TLCS-AP, TNF- α and IL-1 β levels were reduced by 79% and 86%, respectively, in animals treated with fucoidan (Table 2). Fucoidan also reduced the pancreatitis-evoked increase serum nitrite in CER-AP P (60%) and TLCS-AP (52%) (Table 2).

DISCUSSION

Our study has demonstrated novel protective effects of fucoidan in two murine experimental AP models. AP is a disease with clinical presentations ranging from mild to severe forms, the latter associated with high mortality rates, with death caused by dysfunction in other organs besides the pancreas. In both mild and severe forms of pancreatitis neutrophils play important roles [19]. In agreement with previous evidence, increased serum amylase and lipase levels, pancreatic and lung MPO activity were observed in both cerulein hyperstimulation and bile acid infusion models, with extensive histological pancreatic damage evident. Certain differences between the models with respect to the severity of inflammation were detected. For example, increases of serum nitrite, TNF- α and IL-1 β cytokines, and pancreatic MPO, were greater in the TLC-S compared to the cerulein model, in accord with evidence suggesting that retrograde infusion of bile acids into the mouse pancreatic duct induces a severe form of acute necrotizing pancreatitis [14]. Histological

examination of the pancreas, however, indicated similar levels of damage in both models.

Importantly, fucoidan treatment significantly ameliorated features of AP in both models; augmented levels of serum amylase and lipase, tissue damage and indices of inflammation were all reduced by the sulfated fucan. The most likely explanation for the protective effect of fucoidan in these models of AP is an action to inhibit neutrophil infiltration. In support of this, the MPO activity in pancreas and lung in both AP models was returned to control levels by fucoidan treatment. Furthermore, fucoidan significantly reduced the inflammatory cell infiltrate, assessed by histology, in the pancreas of the bile acid-treated group, a severe AP model with clinical relevance [14].

The present results are consistent with previous reports showing fucoidan inhibition of neutrophil accumulation in inflammatory diseases [11, 20, 21]. Fucoidan has structural similarities to saccharide residues present on endogenous ligands for L- and P-selectins, possessing high affinity for L and P-selectin *in vitro* as well as very low non-specific binding [22]. Moreover, its pharmacological effects as an *in vivo* selectin inhibitor have been assessed in several disease models. Zhang *et al* [23] demonstrated that blocking selectin function using the polysaccharide fucoidan protected against murine colitis, an action associated with abolition of MPO activity in the colon mucosa and marked reduction of TNF- α -induced leukocyte rolling and tissue accumulation. Furthermore, Benlier *et al* [24] showed that fucoidan therapy inhibited the effects of neutrophils on tissue necrosis in rats with electrical burn injury, a neutrophil-mediated tissue damage model.

The selectin blockade by fucoidan treatment *in vivo* has been established as a potential therapy for the prevention of post-ischemic reperfusion injury and

autoimmune cardiac injury, since it decreased serum inflammatory markers, the myocarditis area and inhibited macrophage and CD4-positive T-cell infiltration into the myocardium [25]. Most recently, fucoidan showed a neuroprotective effect in lipopolysaccharide-accelerated cerebral ischemic injury through inhibition of cytokine/chemokine expression and neutrophil recruitment [26]. Our results are thus in accord with the participation of neutrophil recruitment in inflammatory diseases and depletion of neutrophils as a protective measure against tissue injury in AP [6, 27]. Selectin-mediated neutrophil rolling is a prerequisite for the extravasation process of neutrophils in AP, with increased P-selectin expression demonstrated in both taurocholate and cerulein experimental pancreatitis models [28, 29]. Thus, it is likely that the interaction between fucoidan and selectins results in an inhibition of leukocyte rolling, an early and essential step in the process of leukocyte extravasation in AP.

Our data showed that fucoidan inhibited both neutrophil infiltration and reduced the levels of pro-inflammatory cytokines. The link between selectin inhibition and cytokine production may be related to pro-inflammatory compounds secreted from activated leukocytes that activate resident cells in the pancreas, enabling progression of the inflammatory cycle to a systemic inflammatory response syndrome and distant organ injury. Interestingly, a recent study showed that TNF α secretion induced early protease activation and acinar cell necrosis in experimental AP [30], suggesting that inflammatory cell infiltration and activation may be initial events, with neutrophils and macrophages the principal disease drivers. In accord, fucoidan reverted increases of TNF α in both AP models to control levels, highlighting the impact of selectin inhibition on disease progression. It should be noted that other modes of action may be involved in the beneficial effects of fucoidan observed in the

present study. For example, fucoidan is considered a polyvalent reagent, with an effect on the macrophage scavenger receptor [12]. Additionally, fucoidan can induce apoptosis in several human cell lines [31, 32]. Evidence suggests that promotion of apoptosis in pancreatic acinar cells may be protective [33, 34]. Thus necrosis, a major determinant of the severity of AP, is diminished in response to bile acids when apoptosis is promoted [35], whilst inhibition of caspase activity led to severe necrotizing pancreatitis [36]; activation of the apoptotic cell death pathway by fucoidan might be beneficial in AP and forms the basis of a separate investigation.

In conclusion, this study has demonstrated that fucoidan reduced the severity of AP in two murine models, suggesting that inhibition of neutrophil infiltration via selectin modulation may constitute a promising approach for treatment of this disease.

REFERENCES

1. Pandol, SJ, Saluja, AK, Imrie, CW et al. Acute pancreatitis: bench to the bedside. *Gastroenterology*. 2007; 133(3): 1056-1056.
2. Raraty, MG, Connor, S, Criddle, DN, et al. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Curr Gastroenterol Rep*. 2004; 6(2):99-103.
3. Granger, J; Remick, D. Acute pancreatitis: models, markers and mediators. *Shock*. 2005; 24 (Suppl 1): 45–51.
4. Pastor, C. M; Vonlaufen, A; Georgi, F; *et al*. Neutrophil depletion-but not prevention of Kupffer cell activation-decreases the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2006; 28;12(8):1219-24.

5. Dawra, R; Sah, R.P; Dudeja, V; Rishi, L; Talukdar, R; Garg, P; Saluja, A.K. Intra-acinar trypsinogen activation mediates early stages of pancreatic injury but not inflammation in mice with acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 2011; 141(6):2210-2217.
6. Zaninovic V; Gukovskaya, A.S; Gukovsky I; *et al*. Cerulein upregulates ICAM-1 in pancreatic acinar cells, which mediates neutrophil adhesion to these cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000; 279(4):G666-76.
7. Awla, D; Abdulla, A; Zhang, S; *et al*. Lymphocyte function antigen-1 regulates neutrophil recruitment and tissue damage in acute pancreatitis. *Br J Pharmacol*. 2011; 163(2):413-23.
8. Ley, K; Laudanna, C; Cybulsky, M.I; *et al*. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7(9):678-89.
9. Berteau, O; Mulloy, B. Sulfated fucans; fresh perspectives: structures; functions; and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology*. 2003;13:29R-40R.
10. Park, H.Y; Han, M.H; Park, C; *et al*. Anti-inflammatory effects of fucoidan through inhibition of NF- κ B; MAPK and Akt activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglia cells. *Food Chem Toxicol*. 2011; 49:1745-1752.
11. Souza, M.H; Troncon, L.E; Cunha, F.Q; *et al*. Decreased gastric tone and delayed gastric emptying precede neutrophil infiltration and mucosal lesion formation in indomethacin-induced gastric damage in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36(10):1383-90.

12. Barreto, A.R; Cavalcante, I.C; Castro, M.V; *et al.* Fucoidin prevents *Clostridium difficile* toxin-A-induced ileal enteritis in mice. *Dig Dis Sci.* 2008; 53(4):990-6.
13. Frossard, J.L; Saluja, A.K; Mach, N; *et al.* *In vivo* evidence for the role of GM-CSF as a mediator in acute pancreatitis-associated lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002; 283(3):L541-8.
14. Laukkarinen, J.M; Van Acker, G.J; Weiss, E.R; *et al.* A mouse model of acute biliary pancreatitis induced by retrograde pancreatic duct infusion of Na-taurocholate. *Gut.* 2007; 56(11):1590-8.
15. Wildi, S; Kleeff, J; Mayerle, J; *et al.* Suppression of transforming growth factor beta signalling aborts caerulein induced pancreatitis and eliminates restricted stimulation at high caerulein concentrations. *Gut.* 2007; 56(5):685-92.
16. Bradley, P.P; Christensen, R.D; Rothstein, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood.* 1982; 60:618–22.
17. Chen, J.Y; Chiu, J.H; Chen, H.L; *et al.* Human peritoneal mesothelial cells produce nitric oxide: induction by cytokines. *Perit Dial Int.* 2000; v. 20 (6).
18. Cunha, F.Q; Boukili, M.A; Motta, J.I.B; *et al.* Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. *Eur J Pharmacol.* 1993; 6;238(1):47-52.
19. Paterniti, I; Mazzon, E; Riccardi, L; *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonist GW0742 ameliorates cerulein- and taurocholate-induced acute pancreatitis in mice. *Surgery.* 2012; 152(1):90-106.
20. Shimaoka M, Ikeda M, Iida T *et al* Fucoidin, a potent inhibitor of leukocyte rolling, prevents neutrophil influx into phorbol-ester-induced inflammatory sites in rabbit lungs. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 153:307–311.

21. Pinto LG, Cunha TM, Vieira SM *et al.* IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain.* 2010; 148(2):247-56.
22. Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(3):349-74.
23. Zhang XW, Liu Q, Thorlacius H. Inhibition of selectin function and leukocyte rolling protects against dextran sodium sulfate-induced murine colitis. *Scand J Gastroenterol.* 2001; 36(3):270-5.
24. Benlier E, Eskiocak S, Puyan FO *et al.* Fucoidin, a neutrophil rolling inhibitor, reduces damage in a rat electrical burn injury model. *Burns.* 2011; 37(7):1216-21.
25. Tanaka K, Ito M, Kodama M *et al.* Sulfated polysaccharide fucoidan ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2011; 16(1):79-86.
26. Kang GH, Yan BC, Cho GS *et al.* Neuroprotective effect of fucoidin on lipopolysaccharide accelerated cerebral ischemic injury through inhibition of cytokine expression and neutrophil infiltration. *J Neurol Sci.* 2012; 15;318(1-2):25-30.
27. Gukovskaya, A.S.; Pandol, S.J. Cell death pathways in pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreatology.* 2004; v. 4, p. 567–586.
28. Hartman, H; Abdulla, A; Awla, D; *et al.* P-selectin mediates neutrophil rolling and recruitment in acute pancreatitis. *Br J Surg.* 2012; 99(2):246-55.
29. Abdulla, A; Awla, D; Hartman, H; *al.* Platelets regulate P-selectin expression and leukocyte rolling in inflamed venules of the pancreas. *Eur J Pharmacol.* 2012; 5;682(1-3):153-60.

30. Sendler M, Dummer A, Weiss FU; *et al.* Tumour necrosis factor α secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice. *Gut*. 2012 Apr 5.
31. Yamasaki-Miyamoto, Y; Yamasaki, M; Tachibana, H; *et al.* Fucoidan induces apoptosis through activation of caspase-8 on human breast cancer MCF-7 cells. *J Agric Food Chem*. 2009; 57(18):8677–8682.
32. Kim, E.J; Park, S.Y; Lee, J.Y; *et al.* Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. *BMC Gastroenterol*. 2010; 22;10:96.
33. Bhatia M, Wallig MA, Hofbauer B; *et al.* Induction of apoptosis in pancreatic acinar cells reduces the severity of acute pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 246: 476–483.
34. Booth DM, Mukherjee R, Sutton, R; *et al.* Calcium and Reactive Oxygen Species in Acute Pancreatitis: Friend or Foe? *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15(10):2683-98.
35. Booth DM, Murphy JA, Mukherjee R; *et al.* Reactive oxygen species induced by bile acid induce apoptosis and protect against necrosis in pancreatic acinar cells. *Gastroenterology*. 2011; 140(7):2116-25.
36. Mareninova OA, Sung KF, Hong P; *et al.* Cell death in pancreatitis: caspases protect from necrotizing pancreatitis. *J Biol Chem*. 2006; 281:3370-3381

Fig. 1 Effect of fucoidan on the degree of AP. The administration of fucoidan reduced the increase levels of amylase (A, B) and lipase (C, D) induced by AP. CER-AP was induced by cerulein (50 µg/kg, hourly for 12h) and TLCS-AP was obtained by infusion of TLC-S (3%, 50µL). The experimental groups received fucoidan (25 mg/kg, i.v.) before pancreatitis induction. Control group received saline. After 24 hours, amylase and lipase were measured in the serum. Each column represents mean ± S.E.M. of a minimum of 6 animals per group. ^a $p < 0.05$ vs. saline group; ^b $p < 0.05$ vs. cerulein group; ^c $p < 0.05$ vs. TLC-S group; ANOVA and Newman-Keuls test.

Fig. 2 Effect of fucoidan on pancreatitis-induced pancreas histological damage. **(A)** Pancreas of control group; **(B)** pancreas of animals with CER-AP and TLCS-AP showing an extensive pancreatic tissue damage; **(C)** pancreas of CER-AP mice treated with fucoidan showing preservation of tissue; **(D)** Sham group; **(E)** pancreas of animals with TLCS-AP showing extensive disruption of pancreatic architecture with oedema, acinar cell necrosis and inflammatory cell infiltration; **(F)** pancreas of TLCS-AP mice treated with fucoidan showing preservation of tissue. CER-AP was induced by cerulein (50 µg/kg, hourly for 12h) and TLCS-AP was obtained by infusion of TLC-S (3%, 50µL). The experimental groups received fucoidan (25 mg/kg, i.v.) before pancreatitis induction. Control group received saline. Quantitative results from these assessments are shown in Table 1.

Fig. 3. Effect of fucoidan on pancreatic and lung MPO activity in AP. The administration of fucoidan reduced the increase pancreas (A, B) and lung (C, D) MPO activity induced by CER-AP and TLCS-AP. CER-AP was induced by cerulein (50 µg/kg, hourly for 12h) and TLCS-AP was obtained by infusion of TLC-S (3%,

50 μ L). The experimental groups received fucoidan (25 mg/kg, i.v.) before pancreatitis induction. Control group received saline. After 24 hours, MPO activity were measured. Each column represents mean \pm S.E.M. of a minimum of 6 animals per group. ^a $p < 0.05$ vs. saline group; ^b $p < 0.05$ vs. cerulein group; ^c $p < 0.05$ vs. TLC-S group; ANOVA and Newman-Keuls test.

RESULTS

Figure 1

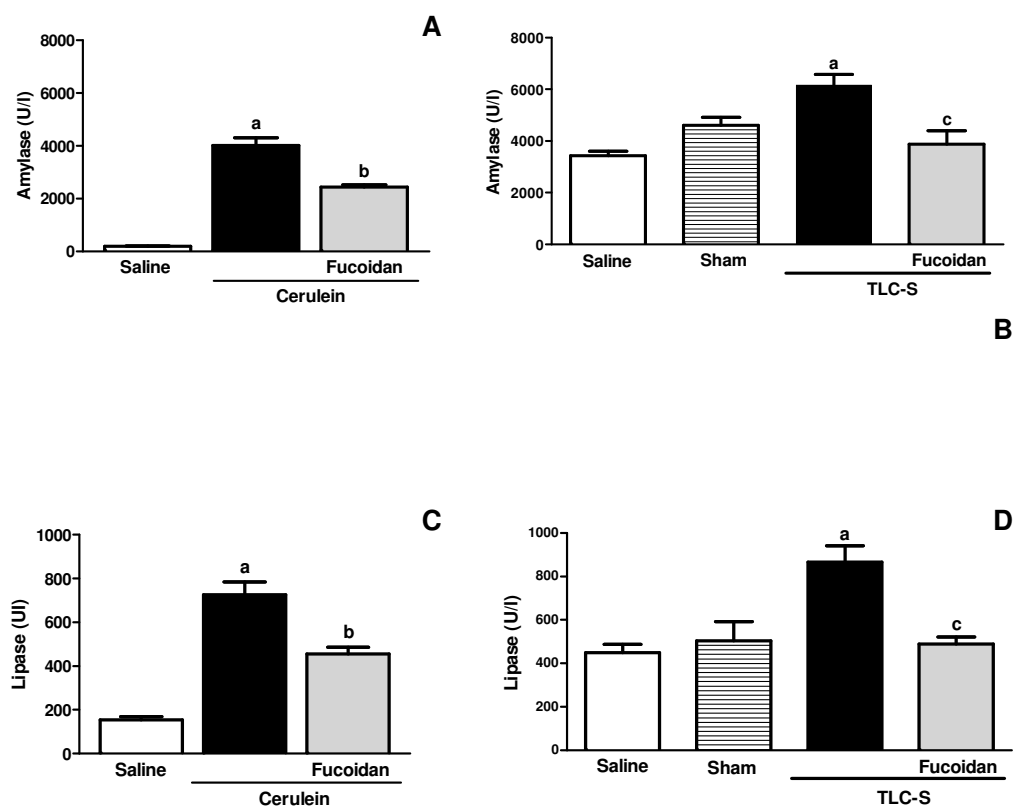


Figure 2

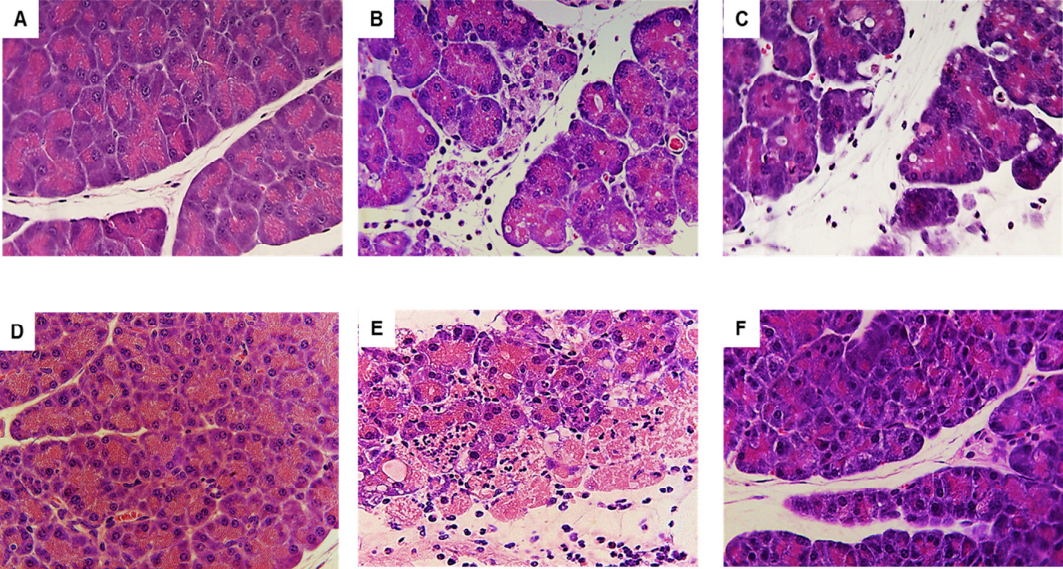


Figure 3

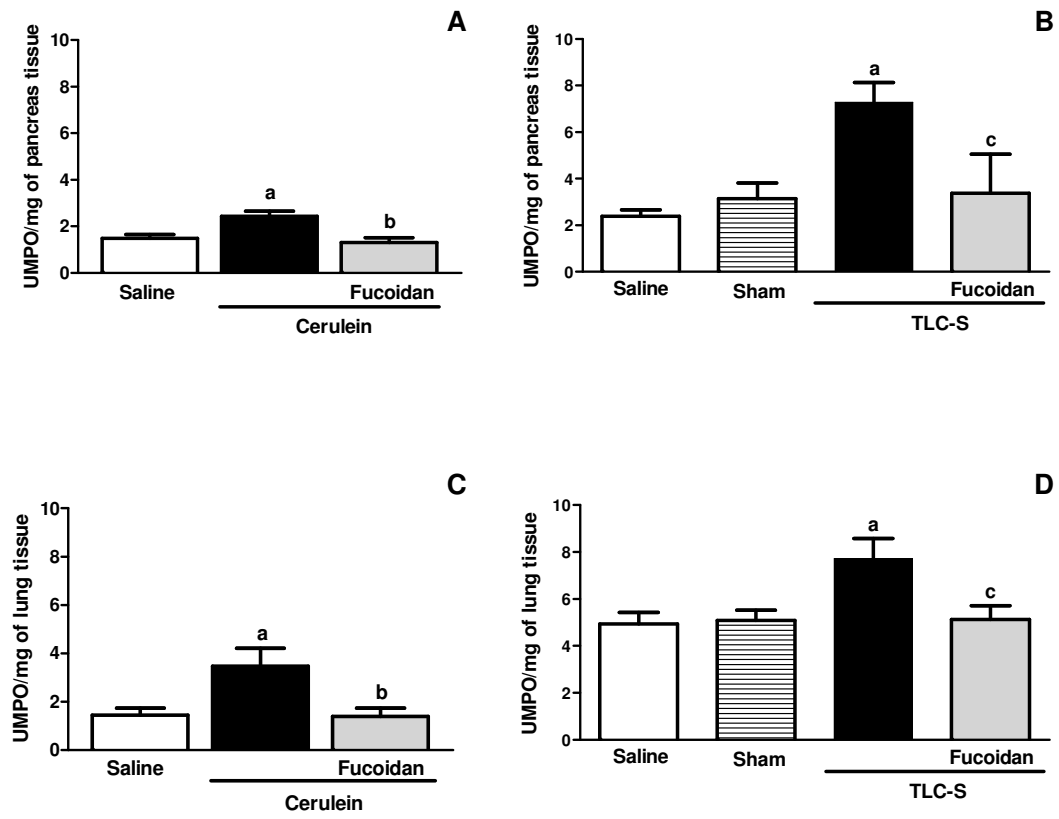


Table 1. Effect of fucoidan on pancreatitis-induced pancreas histological damage

Pancreatitis Model	Treatment	Oedema (0–3)	Inflammatory cell infiltrate (0-3)	Acinar necrosis (0-3)	Overall Scores (0-9)
Cerulein	Saline	1 (1-1)	1 (1-1)	1.5 (1-2)	3.5 (3-4)
	Cerulein	3 (3-3) ^a	3 (3-3) ^a	2.5 (2-3) ^a	8.5 (8-9) ^a
	Cerulein + Fucoidan	2 (2-3)	3 (2-3)	2 (2-3)	7 (6-8) ^b
TLC-S	Saline	2 (1-3)	1 (0-3)	2 (0-3)	5 (2-6)
	Sham	2 (1-3)	1.5 (1-3)	1.5 (1-3)	4.5 (3-7)
	TLC-S	3 (2-3) ^a	2.5 (1-3) ^a	2.5 (2-3) ^a	8 (5-9) ^a
	TLC-S + Fucoidan	1 (1-2) ^c	1 (1-1) ^c	2 (1-2) ^c	4 (3-5) ^c

Median scores with ranges (min–max) of the results on 6 animals in each group are shown. ^ap<0.05 vs saline group, ^bp<0.05 vs cerulein group, ^cp<0.05 vs TLC-S group (ANOVA followed by the Kruskal–Wallis test).

Table 2. Effect of fucoidan on serum TNF- α , IL-1 β and nitrite levels in acute pancreatitis

Pancreatitis Model	Treatment	TNF-α (pg/ml)	IL-1β (pg/ml)	Nitrite (μM)
Cerulein	Saline	68,27 \pm 9,40	12,8 \pm 5,55	2,38 \pm 0,91
	Cerulein	93,50 \pm 1,56 ^a	28,89 \pm 3,95 ^a	17,06 \pm 1,70 ^a
	Cerulein + Fucoidan	70,81 \pm 3,48 ^b	15,07 \pm 8,60 ^b	6,85 \pm 1,49 ^b
TLC-S	Saline	80,96 \pm 36,36	111,9 \pm 3,10	7,81 \pm 2,36
	Sham	28,91 \pm 9,76	121,1 \pm 3,95	12,52 \pm 2,67
	TLC-S	206,9 \pm 47,01 ^a	168,2 \pm 8,60 ^a	46,18 \pm 8,64 ^a
	TLC-S + Fucoidan	42,96 \pm 17,67 ^c	139,1 \pm 3,10 ^c	22,16 \pm 2,97 ^c

Results are means \pm SEM of 6 mice in each group. ^ap<0.05 vs saline group, ^bp<0.05 vs cerulein group, ^cp<0.05 vs TLC-S group (ANOVA followed by the Newman-Keuls test).