

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

CAROLINE MOURÃO MELO

**ESTUDO DO EFEITO FARMACOLÓGICO DA α,β -AMIRINA,
UMA MISTURA DE TRITERPENOS ISOLADA DE *Protium
heptaphyllum*, NA PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL**

FORTALEZA-CE

2009

CAROLINE MOURÃO MELO

**ESTUDO DO EFEITO FARMACOLÓGICO DA α,β -AMIRINA,
UMA MISTURA DE TRITERPENOS ISOLADA DE *Protium
heptaphyllum*, NA PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador (a):
Prof^a. Dra. Flávia Almeida Santos

Fortaleza

2009

M485e Melo, Caroline Mourão

**Estudo do efeito farmacológico da α,β -amirina, uma mistura de triterpenos isolada de *Protium heptaphyllum*, na pancreatite aguda experimental / Caroline Mourão Melo. – Fortaleza, 2009.
152f. : il.**

Orientadora: Prof^ª. Dra. Flávia Almeida Santos

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Pancreatite 2. Arginina 3. Ceruleína 4. Citocinas I. Santos, Flávia Almeida (Orient.) II. Título.

CDD: 616.33

CAROLINE MOURÃO MELO

ESTUDO DO EFEITO FARMACOLÓGICO DA α,β -AMIRINA, UMA MISTURA DE TRITERPENOS ISOLADA DE *Protium heptaphyllum*, NA PANCREATITE AGUDA EXPERIMENTAL

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: 23/11/2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Flávia Almeida Santos (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Profa. Dra. Rosilene Moretti Marçal
Universidade Federal de Sergipe-UFS

Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy
Universidade Estadual do Ceará-UECE

Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Miguel Ângelo Nobre e Souza
Universidade Federal do Ceará-UFC

DEDICATÓRIA

Momentos únicos, importantes e algumas vezes difíceis marcaram essa etapa de minha vida! Agradeço a DEUS pela coragem e determinação que me foi concedida para que eu pudesse concluir com sapiência esse relevante trabalho. Noivado, casamento, viagens freqüentes, gravidez, distância de meu companheiro... SAUDADES, angustiante! Que muitas vezes me abateram e outras me deram ainda mais força para que eu continuasse e diminuísse o mais rápido possível a distância entre nós. Saudades mútuas... Que o impediram de acompanhar com afinco o desenvolvimento embrionário de nosso tão amado e esperado FILHO!

Dedico esse trabalho, principalmente a DEUS, e a duas pessoas em especial, que me fizeram sentir e viver histórias inesquecíveis... Ao ALEX, que aprendo a amar mais a cada dia e ao nosso filho, MATEUS, que agora com oito meses, acrescentou em minha VIDA mais um motivo para SORRIR, LUTAR, AMAR... Enfim, para SEGUIR em frente!

SIMPLESMENTE, AMO VOCÊS!

Aos meus pais Maria Soares Mourão e Raimundo Beserra Melo, pelo incentivo na busca de meus objetivos.

À minha irmã Clarisse e ao meu cunhado Glaydson pelo apoio na fase mais importante de minha vida e principalmente pela amizade.

Aos meus irmãos Danilo e Carine por sempre estarem presentes nos mais importantes momentos de minha vida.

Ao mais novo integrante da família, meu afilhado e sobrinho, Felipe, que mesmo tão pequeno, acrescentou em minha vida um motivo a mais para sorrir.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Flávia Almeida Santos pela orientação e confiança que me possibilitou realizar esse importante trabalho.

Ao Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao pela colaboração fundamental para a execução desse trabalho.

À Profa. Dra. Mariana Chaves pelo fornecimento da mistura dos triterpenos α - e β -amirina, a base de realização deste trabalho.

Às Professoras Geanne Matos de Andrade, Gerly Anne de Castro Brito e Adriana Tomé pela contribuição nas avaliações histopatológicas e imunohistoquímicas.

Às Doutorandas Silvéria, Cinthya, Marjorie, Alana e Ana Carla pela colaboração nos meus experimentos e principalmente pela amizade.

Às mestrandas Natália, Talita e Karine pela amizade.

Aos bolsistas de iniciação científica, amigos do curso de pós-graduação, professores e funcionários da Universidade Federal do Ceará que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

A todos os meus familiares pelo carinho, confiança e amizade, principalmente a minha avó Rosila, mãe de todas as virtudes.

À Olinda, Josemildo, Aleson, Amanda e Ana Beatriz, pessoas maravilhosas que fazem parte de minha vida.

Aos meus amigos Karol e Windson sempre presentes em minha vida.

Ao CNPq pelo apoio financeiro

“Seja a mudança que você quer ver no mundo”

Dalai Lama

RESUMO

Os triterpenos pentacíclicos são compostos naturais com atividade antiinflamatória e citoprotetora e são relativamente atóxicos. A pancreatite aguda, uma inflamação aguda do pâncreas, pode levar à síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) e à síndrome da disfunção múltipla de órgãos (MODS), condições que podem levar o paciente ao óbito. Neste trabalho, a mistura de triterpenos pentacíclicos α,β -amirina, isolada do *Protium hepthaphyllum*, foi investigada quanto aos seus efeitos nos modelos de pancreatite aguda induzida por L-arginina em ratos e por ceruleína em camundongos. No modelo de pancreatite aguda induzida por L-arginina, ratos Wistar machos foram tratados com a mistura de α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) ou com o veículo (2% de Tween 80 em água destilada, 10ml/kg) 48, 24 e 1,5h antes da administração de L-arginina (2 x 2,5 g/kg; 1 h de intervalo) ou com metilprednisolona (30 mg/kg, i.m.) 30 min antes da administração de L-arginina. Na pancreatite induzida por ceruleína, camundongos Swiss machos foram tratados com a mistura de α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) ou com o veículo (2% de Tween 80 em água destilada, 10ml/kg) 48, 24 e 1,5h antes da administração de ceruleína (5 x 50 μ g/kg; 1 h de intervalo) ou com talidomida (200 mg/kg, v.o.) 1h antes da administração de ceruleína. Animais tratados apenas com salina (0,9%, NaCl) foram incluídos nos dois modelos. Foram analisados o edema pancreático, níveis séricos de amilase, lipase e citocinas (TNF α , IL-6), mieloperoxidase, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), histologia e imunohistoquímica (TNF- α , iNOS e nitrotirosina) pancreática. L-arginina e ceruleína aumentaram significativamente o edema pancreático e os níveis séricos de amilase, lipase, TNF α , IL-6. A avaliação histopatológica do pâncreas revelou a presença de edema, infiltração neutrofílica, hemorragia, vacuolização e necrose acinar. Foi observado um aumento acentuado na expressão de TNF α , iNOS e nitrotirosina na avaliação por imunohistoquímica. O pré-tratamento com alfa e beta-amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.), metilprednisolona (30 mg/kg, i.m.) ou talidomida (200 mg/kg, v.o.) atenuaram significativamente a severidade da pancreatite aguda induzida tanto por L-arginina, quanto por ceruleína, evidenciado pela redução do edema pancreático, amilase, lipase e citocinas séricas, mieloperoxidase e TBARS pancreático. Além disso, o tratamento com α,β -amirina e com as drogas de referência suprimiram as alterações histopatológicas e a expressão de citocinas e nitrotirosina pancreáticas. Em conjunto, esses resultados indicam que α,β -amirina melhora a severidade da pancreatite aguda induzida por L-arginina ou ceruleína por agir como antiinflamatório e antioxidante.

Palavras Chaves

Pancreatite; Triterpeno; α,β -Amirina; Arginina; Ceruleína; Citocinas; Rato; Camundongo

ABSTRACT

Triterpenes are natural compounds with anti-inflammatory and cytoprotective effects relatively non-toxic. Acute pancreatitis, an inflammation of the pancreas, may lead to systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and multiple organ dysfunction syndrome (MODS), conditions that can lead the patient to death. In this study, a mixture of triterpenes isolated from *Protium hepthaphyllum* was investigated for their effects in models of acute pancreatitis. In the model of acute pancreatitis induced by L-arginine, male Wistar rats were treated with a mixture of α,β -amyrin (10, 30 and 100 mg/kg, p.o.) or with vehicle (2% Tween 80 in distilled water, 10 ml/kg) 48, 24 and 1.5 h before the administration of L-arginine (2 x 2.5 g/kg, 1 h apart) or with metilprednisolone (30 mg/kg, i.m.) 30 min before the administration of L-arginine. In cerulein-induced pancreatitis, male Swiss mice were treated with a mixture of α,β -amyrin (10, 30 and 100 mg/kg, p.o.) or with vehicle (2% Tween 80 in distilled water, 10 ml/kg) 48, 24 and 1.5 h before administration of cerulein (5 x 50 mg/kg, 1 h apart) or with thalidomide (200 mg/kg, p.o.) 1h before administration of cerulein. Animals treated with saline (0.9% NaCl) were included in both models. We analyzed the pancreatic edema, serum amylase, lipase and cytokines (TNF- α , IL-6), myeloperoxidase, reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS), histology and immunohistochemistry (TNF- α , iNOS and nitrotyrosine) pancreatic. L-arginine and cerulein significantly increased pancreatic edema and serum levels of amylase, lipase, TNF- α and IL-6. Histopathologic evaluation of pancreas revealed the presence of edema, neutrophil infiltration, hemorrhage, acinar vacuolization and necrosis. We observed a marked increase in the expression of TNF- α , iNOS and nitrotyrosine in the evaluation by immunohistochemistry. The pre-treatment with alpha and beta-amyrin (10, 30 and 100 mg/kg, p.o.), metilprednisolone (30 mg/kg, i.m.) or thalidomide (200 mg/kg, p.o.) significantly attenuated the severity of acute pancreatitis induced by either L-arginine, and by cerulein, as evidenced by the reduction of pancreatic edema, amylase, lipase and serum cytokines, myeloperoxidase and pancreatic TBARS. Furthermore, treatment with α,β -amyrin and the reference drugs suppressed the histopathological changes and expression of cytokines and nitrotyrosine pancreatic. Together, these results indicate that the mixture of α,β -amyrin reduces the severity of acute pancreatitis induced by L-arginine or cerulein acting as anti-inflammatory and antioxidant agent.

Keywords

Pancreatitis; Triterpene; α,β -Amyrin; Arginine; Cerulein; Cytokines; Rate; Mice

LISTA DE SIGLAS

±	mais ou menos
%	Porcentagem
®	Marca registrada
α	Alfa
β	Beta
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
°C	Grau centígrado
ANOVA	Análise de variância
aICAM-1	Anti molécula de adesão intercelular-1
Ca ²⁺	Íon cálcio
CCK	Colecistocinina
c-fos	Oncogene c-fos
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
c-NOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
COX-2	Ciclooxigease-2
CPRE	Colangiopancreatografia retrógrada endoscópica
CSE	Cistationina-γ-liase
CTBS	Cistationina-B-sintase
CTSB	Catepsina B
DAB	Solução substarto cromógeno
DI	Decilitro
DL-50	Dose letal 50
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E.P.M.	Erro padrão da média
ERRO(s)	Espécies reativas de oxigênio
et al.	...e colaboradores
G	Grama
GRO-α/CINC	Oncogene-α relacionado ao crescimento/quimioatraente de neutrófilos indutor de quimiocina
H	Hora
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HTAB	Hexadeciltrimetilamônio
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL	Interleucina
i.m.	Intramuscular
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
i.p.	Intraperitoneal
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilograma
L	Litro
L-arg	L-arginina
L-NAME	N G- Nitro-L-arginina metil éster
Mg	Miligrama
min.	Minuto

Mm	Milimolar
MI	Mililitro
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito-1
MDA	Malonilaldeído
MPO	Mieloperoxidase
NF- κ B	NF-KappaB
NEP	Endopeptidase neutra
NK1	Receptores de neurocinina 1
Nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH ⁻	Hidroxil
ONOO ⁻	Peroxinitrito
P	Peso
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAF-AH	PAF-acetilhidrolase
PAG	Propargilglicina
PAT	Peptídeo ativador de tripsinogênio
PBS	Tampão fosfato
Pg	Picograma
PGE	Prostaglandina E
PKC	Proteína quinase C
PLA	Fosfolipase
METILPRED	Metilprednisolona
P	Nível de significância
PA	Pancreatite aguda
PC	Pancreatite crônica
SNAREs	Proteína receptora ao fator sensível à N-etilmaleimida
TAL	Talidomida
TC	Tomografia computadorizada
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TRPV-1	Receptores vanilóide-1
U	Unidade
V	Volume
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VIP	Polipeptídeo intestinal vasoativo
v.o.	Via oral

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
Tabela 1 -	Marcadores séricos determinantes do diagnóstico e prognóstico da doença	36
Tabela 2 -	Tratamento farmacológico da pancreatite aguda. Revisão de drogas testadas em modelos animais experimentais e triagem clínica	36
Tabela 3 -	Efeito do tratamento com α,β -amirina sobre as alterações morfológicas observadas em resposta ao tratamento com L-arg	71
Tabela 4 -	Efeito do tratamento com α,β -amirina sobre a intensidade de reação observada nas lâminas de imunohistoquímica para a determinação de iNOS em resposta ao tratamento com L-arg	73
Tabela 5 -	Efeito do tratamento com α,β -amirina sobre a intensidade de reação observada nas lâminas de imunohistoquímica para a determinação de TNF- α em resposta ao tratamento com L-arg	75
Tabela 6 -	Efeito do tratamento com α,β -amirina sobre a intensidade de reação observada nas lâminas de imunohistoquímica para a determinação de nitrotirosina em resposta ao tratamento com L-arg	77
Tabela 7 -	Efeito do tratamento com α,β -amirina sobre as alterações morfológicas observadas em resposta ao tratamento com CER	86
Tabela 8 -	Efeito do tratamento com α,β -amirina sobre a intensidade de reação observada nas lâminas de imunohistoquímica para a determinação de TNF- α em resposta ao tratamento com CER	88
Tabela 9 -	Efeito do tratamento com α,β -amirina sobre a intensidade de reação observada nas lâminas de imunohistoquímica para a determinação de iNOS em resposta ao tratamento com CER	90

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1 -	Estrutura do pâncreas (cabeça, corpo e cauda)	20
Figura 2 -	Os ácinos (unidade funcional do pâncreas exócrino)	21
Figura 3 -	Características fisiopatológicas do desenvolvimento da pancreatite aguda	27
Figura 4 -	Pancreatite aguda: ativação de enzimas digestivas nas células acinares e mudanças patológicas	27
Figura 5 -	Fotografia da espécie <i>Protium heptaphyllum</i> March	44
Figura 6 -	Fotografia ilustrando folhas e frutos do <i>Protium heptaphyllum</i>	44
Figura 7 -	Fotografia ilustrando queima do exsudato óleo-resinoso do <i>Protium heptaphyllum</i>	45
Figura 8 -	Estrutura química dos triterpenos pentacíclicos α - e β -amirina	45
Figura 9 -	Processo de isolamento da mistura dos triterpenos α - e β -amirina da resina de <i>Protium heptaphyllum</i> March	54
Figura 10 -	Efeito de α - e β -amirina (α,β -amirina) e METILPRED sobre os níveis de amilase sérica em resposta a administração de L-arg em ratos	62
Figura 11 -	Efeito de α,β -amirina e METILPRED sobre os níveis de lipase sérica em resposta a administração de L-arg em ratos	63
Figura 12 -	Efeito de α,β -amirina e METILPRED sobre o grau de edema pancreático em resposta a administração de L-arg em ratos	64
Figura 13 -	Efeito de α,β -amirina e METILPRED sobre o aumento da atividade de MPO em resposta a administração de L-arg em ratos	65
Figura 14 -	Efeito de α,β -amirina e METILPRED sobre o aumento de TBARS em resposta a administração de L-arg em ratos	66

Figura 15 -	Efeito de α,β -amirina e METILPRED sobre o aumento dos níveis teciduais de nitrato e nitrito em resposta a administração de L-arg em ratos	67
Figura 16 -	Efeito de α,β -amirina e METILPRED sobre os níveis séricos de TNF- α em resposta a administração de L-arg em ratos	68
Figura 17 -	Efeito de α,β -amirina e METILPRED sobre os níveis séricos de IL-6 em resposta a administração de L-arg em ratos	69
Figura 18 -	Fotomicrografia representativa do tecido pancreático de ratos submetidos a administração de altas doses de L-arg	70
Figura 19 -	Imunorreatividade para a determinação de iNOS no tecido pancreático de ratos submetidos à administração de altas doses de L-arg	72
Figura 20 -	Imunorreatividade para a determinação de TNF- α no tecido pancreático de ratos submetidos à administração de altas doses de L-arg	74
Figura 21 -	Imunorreatividade para a determinação de nitrotirosina no tecido pancreático de ratos submetidos à administração de altas doses de L-arg	76
Figura 22 -	Efeito de α,β -amirina e TAL sobre os níveis de amilase sérica em resposta a administração de ceruleína (CER) em camundongos	78
Figura 23 -	Efeito de α,β -amirina e TAL sobre os níveis de lipase sérica em resposta a administração de CER em camundongos	79
Figura 24 -	Efeito de α,β -amirina e TAL sobre o grau de edema pancreático em resposta a administração de CER em camundongos	80
Figura 25 -	Efeito de α,β -amirina e TAL sobre o aumento de MPO em resposta a administração de CER em camundongos	81

Figura 26 -	Efeito de α,β -amirina e TAL sobre o aumento de TBARS em resposta a administração de CER em camundongos	82
Figura 27 -	Efeito de α,β -amirina e TAL sobre os níveis séricos de TNF- α em resposta a administração de CER em camundongos	83
Figura 28 -	Efeito de α,β -amirina e TAL sobre os níveis séricos de IL-6 em resposta a administração de CER em camundongos	84
Figura 29 -	Fotomicrografia representativa do tecido pancreático de camundongos submetidos à administração de altas doses de CER	85
Figura 30 -	Imunoreatividade para a determinação de TNF- α no tecido pancreático de camundongos submetidos à administração de altas doses de CER	87
Figura 31 -	Imunoreatividade para a determinação de iNOS no tecido pancreático de camundongos submetidos à administração de altas doses de CER	89

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Generalidades	18
1.2. O pâncreas	19
1.2.1. Pancreatite.....	22
1.2.2. Pancreatite Aguda.....	23
1.2.2.1. Revisão Bibliográfica.....	24
1.2.2.2. Quadro clínico, diagnóstico e tratamento.....	33
1.2.2.3. Modelos experimentais de pancreatite aguda.....	37
1.2.2.3.1. Pancreatite aguda induzida por L-arginina.....	38
1.2.2.3.2. Pancreatite aguda induzida por ceruleína.....	39
1.2.3. Plantas medicinais e pancreatite.....	40
1.3. <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) March.	43
1.3.1. Alfa e Beta- amirina.....	46
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	47
3. OBJETIVOS	49
3.1. Geral	49
3.2. Específicos	49
4. MATERIAIS	50
4.1. Material botânico	50
4.2. Animais experimentais	50
4.3. Drogas e reagentes	51
4.4. Equipamentos	52
5. MÉTODOS	53
5.1. Obtenção da mistura dos triterpenos α,β-amirina (extração e fracionamento)	53
5.2. Caracterização da atividade da mistura de α,β-amirina na pancreatite aguda induzida pela administração de L-arginina em ratos e ceruleína em camundongos	55
5.2.1. Pancreatite aguda induzida por L-arginina.....	55
5.2.2. Pancreatite aguda induzida por ceruleína.....	55
5.2.3. Determinação de amilase e lipase sérica.....	56
5.2.4. Determinação do grau de edema pancreático.....	56
5.2.5. Determinação da atividade da mieloperoxidase.....	56
5.2.6. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	57
5.2.7. Determinação de nitrato e nitrito.....	57
5.2.8. Determinação sérica de TNF- α e IL-6.....	58
5.2.9. Avaliação histológica do pâncreas.....	58
5.2.10. Estudo imunohistoquímico para a determinação de TNF- α , iNOS e nitrotirosina.....	59
5.3. Análise estatística	60
6. RESULTADOS	61
6.1. Obtenção da mistura dos triterpenos α,β-amirina (identificação)	61
6.2. Pancreatite aguda induzida por L-arginina e ceruleína	61
6.3. Caracterização da atividade da mistura de α,β-amirina na pancreatite aguda induzida pela administração de L-arginina em ratos	62
6.3.1. Determinação de amilase sérica.....	62
6.3.2. Determinação de lipase sérica.....	63

6.3.3.	Determinação do grau de edema pancreático	64
6.3.4.	Determinação da atividade da mieloperoxidase	65
6.3.5.	Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	66
6.3.6.	Determinação de nitrato e nitrito	67
6.3.7.	Determinação sérica de TNF- α	68
6.3.8.	Determinação sérica de IL-6.....	69
6.3.9.	Avaliação histológica do pâncreas.....	70
6.3.10.	Estudo imunohistoquímico para a determinação de iNOS.....	72
6.3.11.	Estudo imunohistoquímico para a determinação de TNF- α	74
6.3.12.	Estudo imunohistoquímico para a determinação de nitrotirosina.....	76
6.4.	<i>Caracterização da atividade da mistura de α,β-amirina na pancreatite aguda induzida pela administração de ceruleína em camundongos.....</i>	78
6.4.1.	Determinação de amilase sérica	78
6.4.2.	Determinação de lipase sérica.....	79
6.4.3.	Determinação do grau de edema pancreático	80
6.4.4.	Determinação da atividade da mieloperoxidase	81
6.4.5.	Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	82
6.4.6.	Determinação sérica de TNF- α	83
6.4.7.	Determinação sérica de IL-6.....	84
6.4.8.	Avaliação histológica do pâncreas.....	85
6.4.9.	Estudo imunohistoquímico para a determinação de TNF- α	87
6.4.10.	Estudo imunohistoquímico para determinação de iNOS	89
7.	DISCUSSÃO	91
8.	CONCLUSÕES.....	109
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

1. INTRODUÇÃO

1.1. Generalidades

Desde muito tempo, os produtos naturais, notavelmente os originados de plantas, tem sido uma importante fonte de agentes terapêuticos. Aproximadamente vinte e cinco por cento de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivadas de produtos naturais (CALIXTO, 2005). Assim, as plantas medicinais tornaram-se o grande alvo das indústrias farmacêuticas e institutos de pesquisa na busca de novas drogas e compostos com atividade terapêutica (EVANS, 1996).

As plantas medicinais têm sido utilizadas tradicionalmente para o tratamento de várias enfermidades. Sua aplicação é vasta e abrange desde o combate ao câncer até os microrganismos patogênicos (SILVA et al., 2004; CALIXTO, 2000). As plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos, para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica, como a emetina, a vincristina, a colchicina e a rutina (CECHINEL FILHO, 1998).

A pesquisa sistemática para a obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica pode ser executada por meio de vários processos. Os mais utilizados são a síntese de novas moléculas, a modificação molecular de substâncias naturais e/ou sintéticas com propriedades farmacológicas definidas, extração, isolamento e purificação de novos compostos de fontes naturais, especialmente de origem vegetal, as quais se caracterizam como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamento (DI STASI, 1996). Devido principalmente ao avanço da química combinatória, as pesquisas sobre produtos naturais na indústria farmacêutica teve um lento declínio. Todavia, relevantes evidências para as companhias farmacêuticas mostraram que para algumas doenças complexas, os produtos naturais ainda representam um grande valor para a produção de novas entidades químicas (CALIXTO, 2005).

No Brasil, especialmente na Região Nordeste, o uso de plantas medicinais e preparações caseiras assumem importância fundamental no tratamento das patologias que afetam as populações de baixa renda, tendo em vista a deficiência da assistência médica, a influência da transmissão oral dos hábitos culturais e a disponibilidade da flora (MATOS, 1989).

Juntos, os países da América Latina possuem grande parte da biodiversidade do mundo. O Brasil sozinho possui de 20 a 22% de todas as plantas e microorganismos existentes. Todavia, é estimado que não mais do que 25.000 espécies de plantas foram objetos de alguma investigação científica. (CALIXTO, 2005). Contudo, o potencial dos produtos de origem natural, como fontes de novas drogas, continua largamente inexplorado uma vez que somente pequena fração de plantas, animais e microorganismos têm sido investigados fitoquímica e biologicamente (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991).

Com o objetivo de assegurar o acesso, uso correto de plantas medicinais e fitoterápicos pela população, bem como à utilização sustentável da biodiversidade brasileira e o desenvolvimento da indústria nacional, foi aprovado no dia 22 de junho de 2006 a Política Nacional de Plantas Medicinais e fitoterápicos pelo governo federal (BRASIL, 2006).

1.2. O pâncreas

Apesar de o pâncreas ser conhecido desde a Grécia Clássica, só em 1579 Ambrose Paré fez a primeira descrição clara da pancreatite aguda (PA). Em 1856 Claude Bernard induziu pela primeira vez PA no cão, descobrindo o efeito da lipase, florescendo então o interesse por este órgão. Em 1883 Chiari admitia que a PA fosse causada pela ativação intrapancreática de enzimas proteolíticas, estabelecendo a teoria da autodigestão do órgão. Reginald Fitz, em 1889, apresentou um estudo clínico a partir de análise de material patológico de 53 doentes com PA, constituindo uma obra de referência na investigação e tratamento da PA durante um século. Em 1895 Mouret sugeriu a hiperestimulação colinérgica

como o responsável por aquele fenômeno e em 1901 Eugene Opie enfatizou a relação causal com a litíase biliar e propôs a teoria do “canal comum” (NEOPTOLEMOS, 1989).

O pâncreas é uma glândula de aproximadamente 15 cm de extensão que se localiza atrás do estômago e entre o duodeno e o baço. Ele pode ser dividido em cabeça, corpo e cauda (Figura 1).

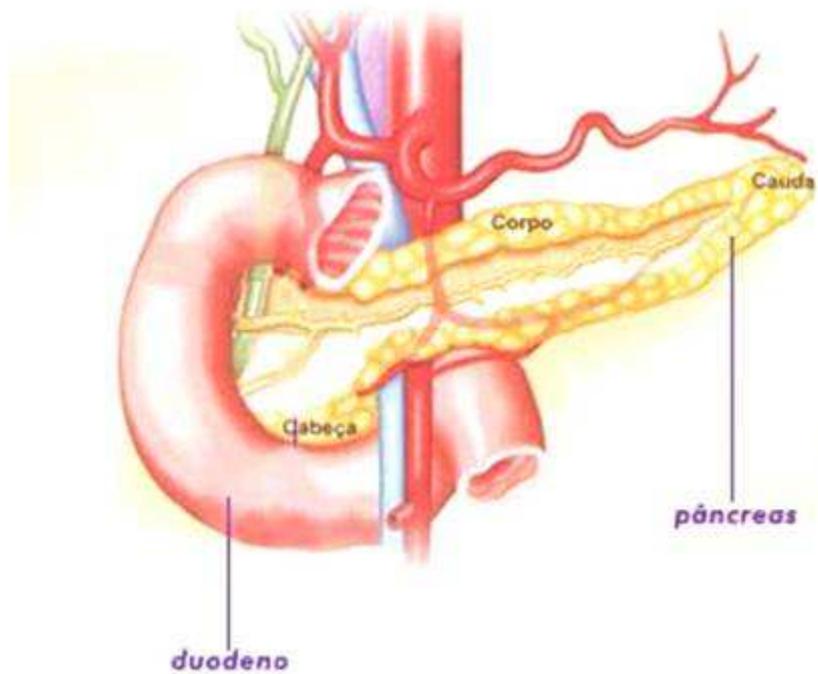


Figura 1. Estrutura do pâncreas (cabeça, corpo e cauda)

O pâncreas possui duas unidades funcionais, a exócrina e a endócrina. O pâncreas endócrino consiste das ilhotas de Langerhans, que produzem insulina, glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático, que funcionam na manutenção da homeostasia da glicose. O pâncreas exócrino é constituído pelos ácinos e por ductos, que drenam os ácinos, cujas funções primárias são a síntese e secreção dos componentes enzimático e aquoso do suco pancreático, responsáveis pela digestão dos alimentos e pela neutralização dos conteúdos duodenais (LEUNG & IP, 2006).

O pâncreas exócrino é estruturalmente semelhante a um “cacho de uvas”, sua arquitetura contém túbulos que são cercados por células adjacentes com formato piramidal, as células acinares, levando à formação de estruturas chamadas

de ácinos (Figura 2). Os ácinos estão rodeados por tecido conjuntivo suportando uma rede de capilares e terminações nervosas. A principal função das células epiteliais colunares, que revestem os ductos pancreáticos, é a secreção do componente aquoso do suco pancreático, uma solução alcalina, rica em água e bicarbonato, que facilita o transporte das enzimas digestivas e aumenta o pH duodenal para uma ação ótima dessas enzimas. As células acinares são especializadas na síntese, armazenamento e secreção de enzimas digestivas, proteases (tripsina, quimiotripsina, elastase, carboxipeptidase), α -amilase, lipases (triacilglicerol hidrolase, hidrolase de éster do colesterol, fosfolipase A2), ribonuclease, desoxirribonuclease e inibidor da tripsina (WHITCOMB et al., 1999; GODINHO, 1997).

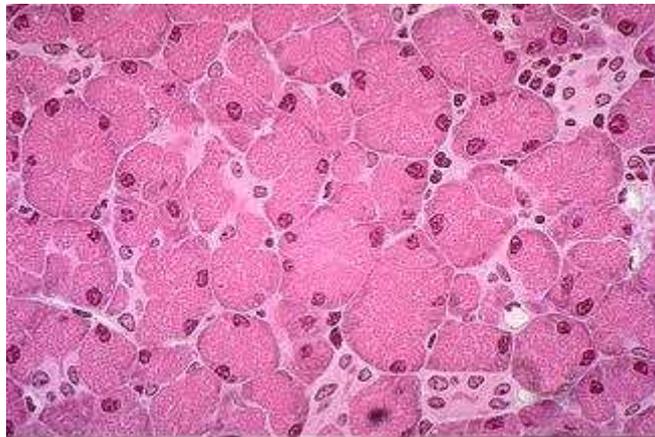


Figura 2. Os ácinos (unidade funcional do pâncreas exócrino)
(Figura adaptada a partir de DAWRA et al., 2006)

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). As enzimas digestivas contidas nos grânulos de zimogênio encontram-se na forma de precursores inativos (tripsinogênio, quimiotripsinogênio e procarboxipeptidase), ativando-se apenas no lúmen intestinal por hidrólise do tripsinogênio em tripsina. A tripsina, uma vez ativada, funciona como autocatalizadora e desencadeia a ativação das pró-enzimas restantes. Pequenas quantidades de tripsina podem formar-se fisiologicamente no pâncreas, sendo eficientemente controladas pelos mecanismos de síntese de inibidores específicos da tripsina pancreática, como inibidores

serinoproteases tipo Kazal 1 (PSTI ou SPINK 1), autólise da tripsina ativada e inativação sistêmica pelas antiproteases séricas (FROSSARD et al., 2008).

Os inibidores da tripsina pancreática se ligam e inativam aproximadamente 20% da tripsina potencial dos grânulos de zimogênio, através da inibição competitiva do domínio catalítico da tripsina (HIROTA et al., 2006). Se a ativação intra-acinar de tripsina ultrapassar a capacidade inibitória do SPINK 1, ainda há uma segunda linha de defesa efetuada pela hidrólise irreversível mediada por proteases catiônicas em que se inclui a própria tripsina (SZMOLA et al., 2003). A terceira e última linha de defesa à cascata de ativação das proteases é a inibição sérica pela α 2-macroglobulina, α 1-antitripsina, antiqumiotripsina, inter-a-tripsina e C1 esterase que estão presentes em abundância no interstício pancreático (VEGE & CHARI, 2007).

Uma vez falhando os mecanismos inibitórios da tripsina pancreática, a tripsina ativada nas células acinares leva a ativação de várias enzimas. Adicionalmente, a inflamação é iniciada com a produção local de mediadores, a qual se relaciona com a severidade da doença (NORMAN et al., 1996).

1.2.1. Pancreatite

A pancreatite aguda (PA) é uma desordem inflamatória do pâncreas exócrino caracterizada por edema pancreático, necrose acinar, hemorragia e necrose lipídica assim como inflamação e infiltração perivascular do pâncreas, podendo ainda atingir outros órgãos como fígado e pulmões. Os pacientes apresentam dor abdominal, náuseas e vômitos e aumento dos níveis séricos de lipase e amilase. Embora a maioria dos episódios de PA seja discreta, com recuperação total dos pacientes, ataques agudos recorrentes podem acarretar em mudanças irreversíveis no pâncreas, caracterizadas por atrofia acinar e fibrose (pancreatite crônica) (TATTERSALL et al., 2008).

A pancreatite crônica é uma condição caracterizada por um dano progressivo e irreversível de ambos os componentes, exócrinos e endócrinos, do pâncreas, resultando eventualmente em uma dor intensa, grande insuficiência exócrina (má-digestão) e diabetes (DIMAGNO et al., 1993). Estima-se que nos países industrializados a incidência de pancreatite crônica varia numa proporção de 3,5 a 10% da população. O abuso de álcool está associado a maior parte dos casos. No entanto, outros fatores, assim como, pancreatite hereditária, pancreatite tropical (BALAKRISHNAN et al., 2006), pancreatite autoimune, obstrução ductal, ou condições secundárias sistêmicas, tais como hipertrigliceridemia e hipercalcemia estão também implicados (DIMAGNO et al., 1993; AHMED et al., 2006; ETEMAD & WHITCOMB et al., 2001). Existe ainda, uma proporção de casos em que a causa não pode ser identificada (pancreatite idiopática) (AMMANN et al., 1984). Todavia, com o recente progresso na identificação de fatores genéticos, a proporção de casos que permanecem sem causas conhecidas tem diminuído.

1.2.2. Pancreatite Aguda

A PA leve pode ser autolimitada e não necessitar de tratamento, contudo aproximadamente 25% dos pacientes irão apresentar um quadro grave com mortalidade de 30-50%. A mortalidade relacionada aos episódios agudos é causada pela síndrome da resposta inflamatória sistêmica e subsequente falência múltipla de órgãos. Aproximadamente 50% das mortes ocorrem dentro da primeira semana após o início da PA e esses pacientes sofrem um ataque inicial severo e desenvolvem uma reação inflamatória sistêmica exagerada como o desenvolvimento da disfunção múltipla de órgãos e morte. Os pacientes com ataque severo, que sobrevivem à primeira semana, podem desenvolver extensa necrose pancreática retroperitoneal, onde a infecção do tecido necrosado leva a sepse, a resposta inflamatória sistêmica, a falência múltipla de órgãos e a morte (BHATIA et al., 2005; ELFAR et al., 2007).

1.2.2.1. Revisão Bibliográfica

Os ácinos pancreáticos apresentam acentuada importância como células responsáveis pelos eventos iniciais críticos da PA, nesse sentido foram desenvolvidas técnicas para o estudo dos ácinos, ou mesmo das células acinares isoladas. Atualmente, é descrito que a estimulação com acetilcolina, colecistocinina, gastrina ou substância P ativa receptores localizados na membrana basolateral das células acinares, causando a geração de um sinal intracelular de Ca^{2+} , que por sua vez, desencadeia a fusão de grânulos de zimogênios com a membrana apical, levando a secreção das enzimas. Essa fusão é mediada por proteínas receptoras conhecidas como SNAREs (Proteína receptora ao fator sensível à N-etilmaleimida), mecanismo que é desencadeado pelo Ca^{2+} , mas que não está totalmente elucidado. Nesse contexto, há o envolvimento das vias de sinalização de inositol trifosfato/diacilglicerol, que elevam a concentração de Ca^{2+} intracelular, ativam a proteína quinase C, com subsequente desencadeamento da exocitose dependente de Ca^{2+} . Já as vias de sinalização iniciadas pela secretina ou polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP) na membrana basolateral são mediadas pelo aumento dos níveis de AMPc e subsequente ativação da proteína quinase A, também levando à secreção dos grânulos de zimogênio (WILLIAMS, 2001; WASLE & EDWARDSON, 2002). Tais mecanismos representam mecanismos fisiológicos para a secreção dos grânulos de zimogênio. O entendimento dos mesmos pode ser valioso para a compreensão dos 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).

A PA é, portanto, uma doença de patogenia obscura provocada por múltiplas etiologias distintas que iniciam um fenômeno comum central - a ativação intrapancreática das enzimas digestivas - com uma evolução imprevisível. Há mais de um século que a PA é considerada como um processo de autodigestão do pâncreas, resultante da ativação prematura das enzimas pancreáticas. Contudo, os mecanismos fisiopatológicos que condicionam esse fenômeno não estão ainda completamente esclarecidos (SLEISENGER et al., 1998; SPIRO, 1993).

A causa mais comum (30-50%) de pancreatite aguda no cenário clínico é a obstrução biliar, geralmente microlitíase (TOOULI et al., 2002). O alcoolismo é a segunda causa mais comum, e a PA alcoólica recorrente leva à pancreatite crônica (AMMANN & MUELLHAUPT et al., 1994). Infecção, resposta auto-imune, trauma, drogas, procedimentos endoscópicos (ex. CPRE), hiperlipidemia e hiperparatireoidismo representam apenas 10% dos casos dessa doença (LOVE et al., 2009; FRANO et al., 2009; AYOUB et al., 2009; FORTSON et al., 1995; TOOULI et al., 2002; BRUDGE & VANDAN, 1999).

A PA é uma desordem inflamatória, que envolve uma complexa cascata de eventos imunológicos, que afetam, não somente a patogênese da doença, mas o seu curso. Qualquer que seja o evento inicial, que leve a ativação prematura de enzimas digestivas, a progressão da doença pode ser vista em três fases contínuas: inflamação local do pâncreas, resposta inflamatória generalizada e a fase final de falência de múltiplos órgãos (BHATIA et al., 2000; BHATIA et al., 2001; BHATIA, 2002).

Apesar da PA ser uma doença auto-limitada na maioria dos casos, aproximadamente 15-30% destes progridem para uma pancreatite aguda severa (SAP) com uma alta taxa de mortalidade. Apesar da patogênese da PA não estar totalmente elucidada, alguns mecanismos são bem conhecidos: ativação excessiva de leucócitos que leva a uma cascata de reações mediadas por citocinas e mediadores inflamatórios, auto-digestão pancreática, distúrbio da microcirculação pancreática e translocação de bactérias do intestino para o tecido pancreático. Estes mecanismos atuam um sobre o outro (ZHANG et al., 2009).

Mediadores inflamatórios estão envolvidos em todas as etapas do desenvolvimento da pancreatite aguda, sendo responsáveis por provocarem e agravarem distúrbios da microcirculação em todo o corpo, levando à lesão de múltiplos órgãos (MENGER et al., 2001). Os mecanismos pelos quais os mediadores inflamatórios provocam distúrbios da microcirculação são basicamente três. Aumento da permeabilidade capilar e diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo capilar, promoção da contração de artérias e veias e promoção da agregação plaquetária e indução de trombose (ZHANG et al., 2009).

A injúria do ácino pancreático, que permite a liberação de enzimas pancreáticas (tripsina, quimiotripsina e elastase) dentro do tecido pancreático, inicia a autodigestão e conseqüentemente o desenvolvimento da pancreatite aguda. As proteases ativadas (tripsina e elastase) e a quebra da lipase dentro do tecido e membranas celulares causam edema, dano vascular, hemorragia e necrose (figura 3) (NORMAN et al., 1996; BHATIA M, et al. 2005).

Vários caminhos estão envolvidos na conversão intracelular de zimogênios pancreáticos em enzimas ativas. Esses caminhos incluem: Auto-ativação do tripsinogênio em tripsina; Quebra do tripsinogênio em tripsina pela hidrolase lisossomial Catepsina B (CTSB); Diminuição da atividade do inibidor de tripsina intracelular pancreático; Liberação de zimogênios e enzimas lisossomiais dentro do citoplasma e subseqüente ativação proteolítica; Manobras de zimogênios em membranas vinculadas a compartimentos que contém proteases ativas; Captação e tratamento de zimogênios secretados pelos caminhos endocíticos; Aumento da suscetibilidade de zimogênios à proteólise devido à oxidação ou descondensação. Os mecanismos que tem merecido mais destaque são: a auto-ativação do tripsinogênio e a ativação inapropriada do tripsinogênio (GORELICK & OTANI, 1999; GORELICK et al., 1999; NARUSE, 2003) (figura 4).

Em adição, 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. As alterações pancreáticas levam a um aumento das concentrações intracelulares de cálcio, com a redução do pH intracelular, ambos causando ativação prematura do tripsinogênio por meio de uma supra-regulação de NF- κ B. Em adição, a tripsina acarreta na ativação de outras cascatas, incluindo o complemento, cinina-callicreína, coagulação e fibrinólise (ELFAR et al., 2007).

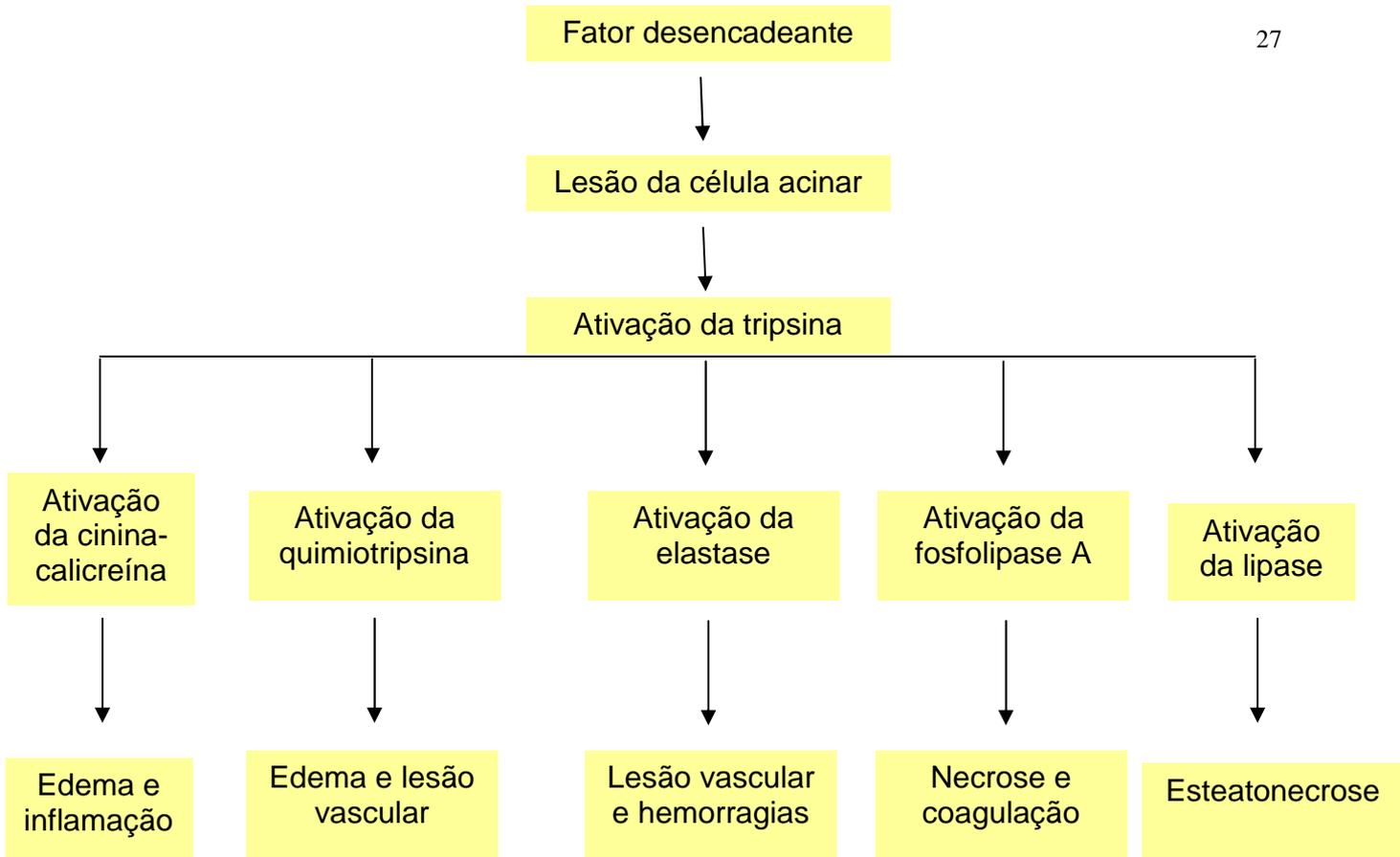


Figura 3. Características fisiopatológicas do desenvolvimento da pancreatite aguda (figura adaptada a partir de BHATIA et al., 2005).

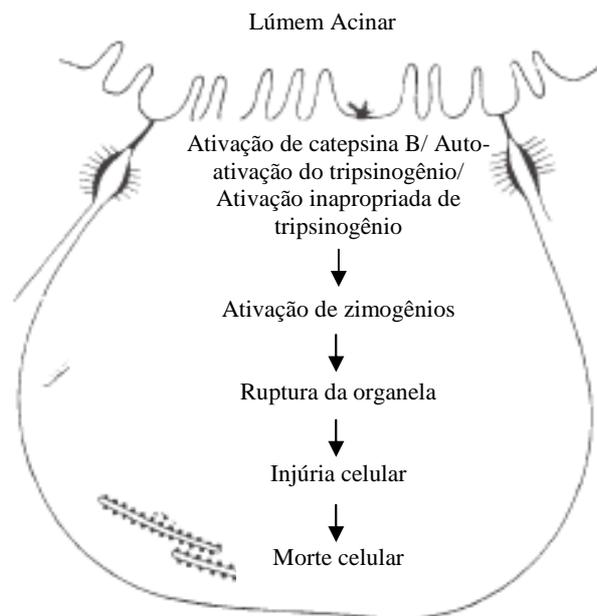


Figura 4. Pancreatite aguda: ativação de enzimas digestivas nas células acinares e mudanças patológicas (adaptado a partir de BHATIA et al., 2005).

O dano celular acinar resulta em uma ativação local do sistema imunológico, incluindo células dendríticas, macrófagos, fibroblastos, células T, células endoteliais, entre outras, que leva a liberação de uma grande quantidade de mediadores inflamatórios (FROSSARD et al., 1999; MAKHIJA & KINGSNORTH, 2002). Diminuição de oxigênio livre do organismo e a geração de radicais livres derivados de oxigênio também contribuem para a injúria (POCH et al., 1999). Assim, independente do fator inicial que levou ao desenvolvimento da doença, a severidade do dano pancreático está relacionada com a injúria das células acinares e ativação de células inflamatórias e endoteliais. Então, complicações locais, necrose da célula acinar, formação de pseudocisto e abscesso, podem se desenvolver, e a injúria em órgãos remotos, tais como os pulmões, podem seguir à liberação de vários mediadores do pâncreas ou de órgãos extra pancreáticos tais como o fígado (PASTOR et al., 2003).

Os mediadores inflamatórios que se acredita participar na fisiopatologia da PA incluem o TNF- α , IL-1 β , IL-6, PAF, ICAM-1, IL-8, GRO- α /CINC (oncogene- α relacionado ao crescimento/quimioatraente de neutrófilos indutor de quimiocina), MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos-1), substância P, peptídeo ativador de tripsinogênio (PAT), o gás sulfídrico (H₂S) e o óxido nítrico (NO). Como mediadores antiinflamatórios que exercem um importante papel na PA temos a IL-10, componente do complemento C5a, receptor solúvel de TNF- α , antagonista de receptor IL-1 (IL-1ra) e endopeptidase neutra (NEP). A expressão de vários desses mediadores é regulada por fatores de transcrição como o NF- κ B. As citocinas levam a uma supra regulação de moléculas de adesão localmente e em órgãos distantes (ex. pulmões) e ativam uma cascata de eventos que incluem a migração de leucócitos, a produção de PLA₂, ativação do complemento, degranulação de neutrófilos, produção de NO e de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MAKHIJA et al., 2002; PEZZILLI et al., 2004; BHATIA et al., 2005; ELFAR et al., 2007).

A ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) e a redução da expressão dos inibidores de κ B foram demonstradas no modelo de PA induzida por ceruleína em ratos (GUKOVSKY et al., 1996; HAN & LOGSDON, 2000; GRADY et al., 1997; BHATIA et al., 2002; BHATIA et al., 2005). Steinle et al. (1999) demonstraram que a

ativação do NF- κ B está envolvida em um aumento da injúria e da inflamação tecidual em modelos experimentais de PA. Outros autores mostraram que a sua inibição atenua a severidade ou melhora a sobrevivência em diferentes modelos experimentais de PA (ETHRIDGE et al., 2002; SATOH et al., 1999; DUNN et al., 1997). Chen et al. (2002) ativaram diretamente o NF- κ B pancreático, o que resultou no início de uma resposta inflamatória pancreática. Nos modelos experimentais de PA induzida pela injeção de taurocolato de sódio, ligação do ducto biliopancreático e L-arginina (L-arg) foi observado um aumento na expressão e/ou ativação do NF- κ B (RAKONCZAY et al., 2008).

Os níveis de TNF- α e IL-1 β estão elevados no início e durante o progresso da PA (BHATIA et al., 2000; BHATIA et al., 2001; BHATIA, 2002; BHATIA et al., 2005; NORMAN et al., 1995; HIROTA et al., 2000). A inibição de TNF- α e IL-1 β atenuam a severidade da pancreatite em diferentes modelos experimentais. O bloqueio do receptor de IL-1 antes ou logo após a indução da PA está associado com a redução da severidade da pancreatite e redução do dano pancreático intrínseco. A neutralização do TNF- α com um anticorpo policlonal reduziu a severidade da PA experimental em ratos. Estratégias que interferem com a tradução de TNF- α e IL-1 β , processamento e liberação intracelular, em vez de antagonizar seus efeitos também diminuem a severidade da PA em modelos experimentais (HUGHES et al., 1996; BHATIA et al., 2005). O TNF- α pode ser determinado no plasma, bem como no tecido pancreático, no curso da PA (de BEAUX et al., 1996; POORAN et al., 2003) e contribui para a progressão sistêmica e danos pancreáticos observados na PA severa (NORMAN, 1998; GRANGER et al., 2005).

A IL-6 possui alta especificidade e sensibilidade em distinguir a PA leve da grave apresentando correlação com as taxas de mortalidade. Quando associada à elevação de lipase sérica, melhora ainda mais a acurácia do diagnóstico e prognóstico (PEZZILLI et al., 1995). Níveis plasmáticos de IL-6 correlacionam-se com anormalidades hemodinâmicas na PA em coelhos (JAMBRIK et al., 2002). Camundongos transgênicos que expressam IL-6 humana são mais susceptíveis a PA, e o uso de anticorpo monoclonal anti-IL-6 exerce um efeito protetor contra a PA (SUZUKI et al., 2000).

O PAF é sintetizado pelos ácinos pancreáticos e as concentrações pancreáticas desse mediador estão elevadas durante o curso da PA (HOFBAUER et al., 1998 e ZHOU et al., 1993). Em modelos animais, injeções intraperitoneal ou intravascular de PAF podem provocar ou aumentar a severidade da PA (KONTUREK et al., 1992 e EMMANUELLI, 1989). Níveis teciduais pulmonares e sanguíneos também aumentam, indicando que PAF é um mediador chave da resposta inflamatória sistêmica (HOFBAUER et al., 1998).

Uma das complicações mais comuns da PA é a injúria pulmonar aguda, onde a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) exerce um importante papel, participando na adesão e ativação de leucócitos, indução de mediadores inflamatórios, disfunção da microcirculação pulmonar, síndrome do estresse respiratório agudo, falência múltipla de órgãos e morte. O mecanismo modulatório da ICAM-1 durante esse processo está associado com a ativação do NF- κ B (ZHANG et al., 2009). O uso de anticorpo monoclonal anti-ICAM-1 (aICAM-1) mostra efeito terapêutico em vários tipos de modelos experimentais de injúria pulmonar aguda (YOKOMURA et al., 2001). Se o aICAM-1 é administrado no estágio inicial da PA observa-se uma melhor proteção do pâncreas e da função pulmonar (WERNER et al., 1998).

A IL-8 se eleva precocemente e é considerada um bom marcador de gravidade na PA (GROSS, 1992). Um anticorpo anti-IL8 humana foi associado com a redução da injúria pulmonar em um modelo experimental de pancreatite aguda em coelhos (SHOKUHI et al., 2002).

MCP-1 e MIP-2 participam na patogênese de PA experimental (XU et al., 2008; ISHIBASHI et al., 2008; BHATIA et al., 2005; BRADY et al., 2002). O aumento da MCP-1 sérica na admissão do paciente com PA está associado com o desenvolvimento de PA severa (REGNÉR et al., 2008). A expressão de CXCL10 e CXCR3 com outras quimiocinas CXC/CC (CXCL9, CXCL11, CCL3, CCL4, CCL5) em tecidos pancreáticos de pacientes com pancreatite crônica sugerem a sua participação na progressão da inflamação crônica (SINGH et al., 2007). A administração de Ac-RRWWCR-NH₂, um potente inibidor da ligação de quimiocinas CXC ao receptor (CXCR2) resultou na proteção de camundongos contra a PA

induzida por ceruleína (BHATIA & HEDGE, 2007). Rau et al. (2003) avaliando pacientes com PA mostraram que a PA complicada está associada com o aumento significativo, local e sistêmico, das concentrações de MCP-1.

A substância P (SP) atuando através dos receptores de neurocinina-1 (NK1) de membranas nas células efectoras, aumenta a permeabilidade microvascular e promove o extravasamento de proteínas plasmáticas do espaço intravascular para o espaço extravascular, com subsequente formação de edema. Foram encontrados níveis pancreáticos elevados de SP e expressão aumentada de NK1 em células acinares durante a pancreatite aguda experimental (BHATIA et al. 1998). Em camundongos geneticamente modificados, desprovido de receptores NK-1, demonstrou-se uma redução na severidade da pancreatite e injúria pulmonar associada à mesma, indicando que a SP, através destes receptores, é um importante mediador da PA e injúria pulmonar (BATHIA et al., 1998, MAA et al., 2000). Além disso, a pancreatite pode ser atenuada por antagonistas do receptor NK1 (BHATIA et al., 2003; GRADY et al., 2000).

O Peptídeo ativador de tripsinogênio (PAT), produto da conversão do tripsinogênio em tripsina, é um marcador validado, que apresenta a melhor correlação com a gravidade da doença. Na pancreatite aguda grave, a inativação inapropriada do tripsinogênio no interior do pâncreas resulta na liberação do PAT no plasma, urina e peritônio. Portanto, a concentração plasmática de PAT parece ser o melhor e mais precoce marcador da pancreatite aguda (BHATIA et al., 2000).

O gás sulfídrico (H_2S) é produzido nos tecidos dos mamíferos a partir dos aminoácidos L-cisteína e hemocisteína pela ação das enzimas cistationina- β -sintase (CBS) e cistationina- γ -liase (CSE). Um aumento na biossíntese de H_2S foi demonstrado em modelos animais de choque séptico e hemorrágico, pancreatite e edema de pata em ratos (BHATIA et al., 2005; LI et al., 2006). Tamizhselvi et al. (2007) e Bathia et al. (2005) demonstraram que na pancreatite experimental induzida por ceruleína ocorre um aumento na expressão de RNAm para a CSE e na biossíntese de H_2S e que a administração de PAG (DL-propargilglicina, um inibidor irreversível da CSE) reduz a severidade e reduz a lesão pulmonar na pancreatite por ceruleína. Tamizhselvi et al. (2008) demonstraram que o efeito pró-inflamatório do

H₂S no modelo de pancreatite experimental por ceruleína pode ser mediado por quimocinas (MIP-1alfa e MIP-2).

A ativação da fosfolipase A₂ contribui para o dano pancreático e para as complicações sistêmicas durante a PA (FRIESS et al., 2001).

A ativação de proteína quinase C (PKC) e a mobilização do Ca⁺² intracelular levam a ativação, induzida pela colecistocinina (CCK), do NF-κB no pâncreas (HAN & LOGSDON, 2000; SHI et al., 2007). A ativação de NF-κB pode aumentar a sensibilidade pancreática à resposta inflamatória através de caminhos de sinalização envolvendo novas ou atípicas isoformas de PKC (GUKOVSKAYA et al., 2004). A PKC ativada pode não somente iniciar a ativação de NF-κB, mas também induzir a produção de mediadores inflamatórios, esta pode ainda ser proteoliticamente ativada por uma variedade de proteases (HASHIMOTO & YAMAMURA, 1989; CHAKRABORTI et al., 2004).

O óxido nítrico (NO) está envolvido na fisiologia da PA (DIMAGNO, 2007; CEVIKEL et al., 2003) e na patogênese da pancreatite crônica (MORSELLI-LABATE et al., 2007). Pacientes com altos níveis séricos de NO apresentam significativamente um maior risco de apresentar sepse e mortalidade (METTU et al., 2003). Muitos estudos mostram um aumento no plasma e no tecido pancreático de NO, assim como uma elevação da atividade de NO sintase (NOS) na pancreatite aguda (CUZZOCREA et al., 2002; DABROWSKI & GABRYELEWICZ, 1994). Em um modelo experimental de PA induzida por dose suprafisiológica de ceruleína em camundongos foi observado um aumento da produção de NO no plasma, pâncreas e pulmões, assim como aumento da expressão de NOS pancreática e pulmonar (ANG et al., 2007). Shields et al (2006) observou que a inibição de iNOS (óxido nítrico sintase induzida) por aminoguanidina (inibidor específico de iNOS) significativamente reduziu a pancreatite em um modelo de PA induzida por L-arg em ratos.

A translocação de bactérias do intestino para o pâncreas também representa grande importância na patogenia da PA. As complicações sépticas

causadas por infecção bacteriana, frequentemente de origem entérica, representam 80% dos casos de morte na PA necrosante. A infecção aos tecidos pancreáticos e peripancreático por bactérias entéricas está diretamente relacionada à magnitude da necrose presente no pâncreas, e tem como provável mecanismo de origem a translocação bacteriana por aumento da permeabilidade da barreira entérica (TARPILA et al., 1993).

1.2.2.2. Quadro clínico, diagnóstico e tratamento

Nem sempre o quadro clínico da PA é característico, o que torna difícil o seu diagnóstico. A dor abdominal constitui a manifestação mais característica da doença, cuja intensidade varia de ligeira e desconfortável a intensa e incapacitante, inicialmente pode ser epigástrica e peri-umbilical podendo se irradiar para o dorso ou para todo o abdômen. Náuseas e vômitos, acompanhados de parada na eliminação de gases e fezes podem estar presentes. O paciente pode ainda apresentar febre, hipotensão, alteração respiratória e distensão abdominal (BANK, 1997 & CARROLL et al., 2007).

Dentre as manifestações sistêmicas da PA grave podemos citar a leucocitose, hemólise, coagulação intravascular disseminada, seqüestro de líquido para o terceiro espaço, síndrome da angústia respiratória do adulto, necrose gordurosa difusa, síndrome da resposta inflamatória sistêmica, síndrome da disfunção múltipla de órgãos (CRAWFORD & COTRAN, 2000; ELFAR et al., 2007).

Não existe um ensaio laboratorial ou um sinal clínico específico que caracterize a PA. A amilase e a lipase, secretadas pelas células pancreáticas, são os marcadores laboratoriais mais utilizados no diagnóstico da doença. A tomografia computadorizada (TC) pode ser realizada na admissão do paciente para a confirmação do diagnóstico e após 4 dias para a observação de complicações como o acúmulo de fluídos e necrose. O exame de ressonância magnética identifica a necrose e o acúmulo de fluídos melhor que o exame de TC (FROSSARD et al., 2008).

Outros exames laboratoriais, tais como o leucograma, transaminases, desidrogenase láctica, cálcio sérico, glicemia, gasometria e creatinina, são particularmente úteis na caracterização da gravidade da doença (BANK et al., 1983; RANSON et al., 1985), o mesmo acontecendo com a dosagem da proteína C reativa (MAYER et al., 1984) e da interleucina-6 (PEZZILLI et al., 1995).

Pesquisas estão sendo realizadas na tentativa de determinar potenciais marcadores biológicos para a severidade e prognóstico da doença. Tripsinogênios e proteases pancreáticas envolvidas no processo de autodigestão pancreática são marcadores promissores. Outros marcadores investigados são alanina transaminase, peptídeo ativador de tripsinogênio (PAT), procalcitonina, fosfolipase A2, proteína C reativa e citocinas como IL-6 e IL-8 (Tabela 1) (KELLY, 1976; BANK et al., 1983; RANSON et al., 1985; GUMASTE et al., 1993; CARROLL et al., 2007).

Na forma mais leve da doença, principalmente aquela devido à presença de cálculo biliar, a terapia é de suporte e inclui a reposição de líquido, alívio da dor, administração de oxigênio, antieméticos e atenção às necessidades nutricionais. Os episódios severos de PA necessitam de uma equipe multidisciplinar (gastroenterologista, radiologista, intensivista e cirurgião) e apesar da instalação de um tratamento apropriado a taxa de mortalidade dos ataques severos não mudou significativamente nas últimas duas décadas. Para esses pacientes, ressuscitação, suporte nutricional e monitoramento de complicações (prevenção de necrose pancreática e prevenção de infecção pancreática, uma vez estabelecida a necrose) são importantes (CARROLL et al., 2007; FROSSARD et al., 2008).

O tratamento tradicional na PA com jejum e nutrição parenteral, tem sido modificado para nutrição enteral na pancreatite severa e ingestão oral na pancreatite leve a moderada. A nutrição enteral reduz as complicações da infecção e a mortalidade na pancreatite severa, comparada a nutrição parenteral (BAKKER et al., 2009; ANDERSSON et al., 2009).

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 PA, 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 et al. (2008) publicaram um artigo de revisão resumizando os resultados da utilização de várias drogas na prevenção e tratamento da PA clínica e experimental (Tabela 2).

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).

Vários centros internacionais recomendam o uso de técnicas menos invasivas no manejo da pancreatite necrosante, como a drenagem percutânea guiada por imagem (PCD) para a melhora da morbidade e mortalidade. Outros recomendam o uso de técnicas endoscópicas para o debridamento da necrose pancreática infectada, como a cirurgia endoscópica trans-luminal por orifício natural (Natural Orifice Translumenal Endoscopic Surgery-NOTES), uma alternativa aos procedimentos abertos (HINES & REBER, 2009).

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. Marcadores séricos determinantes do diagnóstico e prognóstico da doença

Teste Laboratorial	(HORA)	Propósito	Observações clínicas e limitações
Alanina transaminase	12 a 24	Diagnóstico e etiologia	Associado com a pancreatite biliar; três vezes mais elevada na presença de pancreatite aguda, apresentando um valor preditivo positivo de 95% no diagnóstico da pancreatite aguda biliar.
Amilase	2 a 12	Diagnóstico	Mais acurado quando está duas vezes mais elevado do que o normal; os níveis de amilase e a sensibilidade diminuem com o tempo desde o início dos sintomas.
Proteína C reativa	24 a 48	Preditivo de severidade	Marcador tardio, altos níveis está associado com necrose pancreática.
Interleucina-6	18 a 48	Preditivo de severidade	Indicação precoce de gravidade
Interleucina-8	12 a 24	Preditivo de severidade	Indicação precoce de gravidade
Lípase	4 a 8	Diagnóstico	Aumento da sensibilidade na pancreatite induzida por álcool; mais específica e sensível do que a amilase para detectar a pancreatite aguda.
Fosfolipase A ₂	24	Preditivo de severidade	Associado com o desenvolvimento de necrose pancreática e falência pulmonar.
Procalcitonina	24 a 36	Preditivo de severidade	Indicação precoce de gravidade; altas concentrações em necrose infectada.
Peptídeo ativador de tripsinogênio	Em poucas horas	Diagnóstico e preditivo de severidade	Marcador precoce da pancreatite aguda, apresenta uma estreita correlação com a severidade.

Fonte: CARROLL et al. (2007).

Tabela 2. Tratamento farmacológico da pancreatite aguda. Revisão de drogas testadas em modelos animais experimentais e triagem clínica

Nome	Mecanismos	Efeito em modelos animais	Resultados em triagens humanas
Somatostatina	Inibição da secreção pancreática	Não reduz a mortalidade	Não reduz a mortalidade
Octetide	Inibição da secreção pancreática	Não tem efeito (resultados divergentes)	Não reduz a mortalidade
Mesilato de gabexate	Inibidor de protease	Redução de escores histológicos	Pode reduzir a mortalidade
N-acetil-cisteína	Redução do estresse oxidativo	Reduz a severidade	Não reduz a mortalidade
Óxido de nitrogênio	Melhora da microcirculação	Redução do edema	Triagem não publicada
Esteróides	Anti-inflamatório não específico	Redução da mortalidade	Triagem não publicada
Interleucina-10	Anti-inflamatório	Redução da mortalidade	Triagem não publicada
Anticorpo TNF- α	Anti-inflamatório específico	Redução da mortalidade	Triagem não publicada
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: BANG et al. (2008).

1.2.2.3. Modelos experimentais de pancreatite aguda

Em modelos experimentais de pancreatite aguda, as células acinares morrem através de necrose e de apoptose (KAISER et al., 1995; GUKOVSKAYA et al., 1996; MARENINOVA et al., 2006). A razão apoptose/necrose pode variar dentre os diferentes modelos experimentais. A severidade da pancreatite experimental correlaciona-se diretamente com a extensão da necrose e inversamente com a extensão da apoptose (KAISER et al., 1995; GUKOVSKAYA et al., 1996; SALUJA et al., 1996; SANDOVAL et al., 1996; BHATIA, 2004; GUKOVSKAYA & PANDOL, 2004; MARENINOVA et al., 2006), porém os mecanismos que explicam essas diferenças são pouco compreendidos.

A necrose da célula acinar, e em particular, a necrose recorrente, é uma das mais sérias complicações da pancreatite aguda (RARATY et al., 2004; BASSI et al., 2003; CONNOR & NEOPTOLEMOS, 2004). Baseado nas informações de que as formas brandas de pancreatite experimental estão associadas com uma maior taxa de apoptose e de que as formas severas estão associadas com uma maior taxa de necrose existe a hipótese de que a mudança de um quadro de necrose para um quadro de apoptose possa ser benéfica na pancreatite aguda (KAISER et al., 1995; GUKOVSKAYA et al., 1996; SALUJA et al., 1996; SANDOVAL et al., 1996; BHATIA, 2004; GUKOVSKAYA & PANDOL, 2004; MARENINOVA et al., 2006).

Vários modelos experimentais de PA foram desenvolvidos na tentativa de compreensão de sua fisiopatologia, das alterações histológicas, do grau de severidade e da falência de órgãos como os pulmões, rins, fígado e intestino. 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-arg, 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 ou taurocolato de sódio,

pela ligação do ducto biliopancreático ou por indução de alterações vasculares pancreáticas (GRANGER & REMICK, 2005; CHANG & LEUNG, 2007).

Apesar da grande quantidade de modelos experimentais existentes para o estudo da PA, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessa doença ainda não são completamente entendidos, sendo necessários estudos mais aprofundados para um melhor entendimento de sua fisiopatologia, bem como do efeito dos agentes terapêuticos.

1.2.2.3.1. Pancreatite aguda induzida por L-arginina

Uma única injeção intraperitoneal de L-arg (250-500mg/100g/peso corporal) pode induzir uma pancreatite necrosante em ratos, coelhos e camundongos. Após 24 h da injeção de L-arg, a inflamação do tecido pancreático é confirmada por histologia e mudanças características dos parâmetros laboratoriais que podem ser observadas a partir de 12 h após sua administração. Esse modelo é reproduzível, não invasivo e produz necrose acinar de maneira dose dependente, sendo um modelo de estudo da patogênese da pancreatite aguda (CZAKO et al., 2000; DABROWSKI et al., 1999; HEGYI et al., 2004; RAKONCZAY et al., 2003; VARGA et al., 1997; ZHAO et al., 2004; CHAN & LEUNG, 2007).

O mecanismo pelo qual a L-arg induz a PA ainda não está claro. Contudo, seu efeito tóxico sobre o pâncreas deve-se em parte a inibição da síntese protéica, excessiva produção de óxido nítrico e peroxidação lipídica. O excesso de L-arg, assim como de outros aminoácidos básicos, pode suprimir a ornitina descarboxilase, que é a enzima determinante da síntese de poliaminas. A redução dos níveis de poliaminas retarda a síntese de ácidos nucléicos interferindo na síntese protéica. O tecido pancrear é particularmente vulnerável a essa forma de toxicidade (CHAN & LEUNG, 2007). Algumas evidências sugerem que radicais livres de oxigênio, óxido nítrico e mediadores inflamatórios apresentam um papel chave nesse modelo (VARGA et al., 1997; CZAKO et al., 2000; TAKACS et al., 2002; RAKONCZAY et al., 2003).

A L-arginina produz um aumento significativo da amilase plasmática, da razão peso pancreático/peso corporal, dos níveis de IL-6, da atividade da mieloperoxidase (MPO) pancreática, ativação de tripsina, mudanças histológicas (incluindo acumulação de fluídos, destruição da histoarquitetura, vacuolização das células acinares, extensiva necrose de células acinares e infiltração neutrofílica), como também pode produzir injúria pulmonar (CZAKO et al., 2000; DABROWSKI et al., 1999; HEGYI et al., 2004; RAKONCZAY et al., 2003; VARGA et al., 1997; ZHAO et al., 2004; DHARA et al., 2006; SZABOLCS et al., 2006a).

1.2.2.3.2. Pancreatite aguda induzida por ceruleína

A pancreatite induzida por ceruleína, um análogo da CCK, apresenta uma alteração histológica muito semelhante à fase inicial da PA 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. A ativação da tripsina intracelular pode ativar o tripsinogênio e outros zimogênios, iniciando uma série de eventos ativados por proteases. A enzima digestiva uma vez ativada degrada proteínas celulares, incluindo proteínas estruturais (como *F-actin*), o que eventualmente leva a uma autodigestão pancreática (CHAN & LEUNG, 2007).

O modelo experimental com injeções múltiplas de ceruleína tem sido um dos mais utilizados para indução de pancreatite associada com injúria pulmonar em camundongos e ratos. Este modelo é particularmente importante porque a PA associada com injúria pulmonar é uma complicação comum, que contribui de forma significativa, para o aumento da taxa de mortalidade dos pacientes (PASTOR et al., 2003; 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 MPO pancreática e aumento de citocinas pró-inflamatórias (p. ex.: TNF- α e IL-1 β) (MALLEO et al., 2007; GÓMEZ et al., 2006).

Estão presentes nesse modelo espécies reativas do oxigênio (EROS), TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, COX-2, SP e alterações histológicas pancreáticas como degeneração celular acinar, edema e infiltrado inflamatório. Exames imunohistoquímicos demonstraram marcado aumento na imunorreatividade para TGF- β e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) no pâncreas de camundongos tratados com ceruleína (GENOVESE et al., 2006a; WILDI et al., 2007). No fígado podem ser observadas alterações histológicas como necrose, vacuolização, congestão vascular, infiltrado inflamatório. Alterações pulmonares também podem ser observadas (GRANGER & REMICK, 2005; ESREFOGLU et al., 2006; CHAN & LEUNG, 2007; BHATIA et al., 2005, 2007).

1.2.3. Plantas medicinais e pancreatite

A pancreatite aguda apresenta uma incidência de aproximadamente 40 casos por ano por 100.000 adultos e até o momento não se tem um tratamento eficaz para a doença. Pesquisas têm sido realizadas na busca de novas estratégias terapêuticas, dentre elas a pesquisa com produtos naturais. Vários estudos mostram a ação de produtos naturais em modelos experimentais de pancreatite, como podemos citar:

- ❖ Polifenóis do chá verde (Green tea) reduziram as alterações bioquímicas e histológicas em modelo de pancreatite aguda por ceruleína em camundongos, pela redução da ativação do NF- κ B e do estresse oxidativo (BABU et al., 2009). O extrato do chá verde, devido ao seu potencial antioxidante, pode

prevenir a fibrose pancreática pela inibição da ativação das células do interstício do pâncreas como evidenciado em um estudo experimental realizado *in vitro* (ASAUMI et al., 2006).

- ❖ *Salvia miltiorrhizae*, uma planta da medicina chinesa, reduziu o conteúdo de endotoxina plasmática e IL-6 sérica, promoveu a expressão de proteína Bax no pâncreas e melhorou as alterações patológicas pancreáticas assim como reduziu a mortalidade em modelo de pancreatite severa induzida por taurocolato de sódio em ratos (RUIPING et al., 2009).
- ❖ O extrato de *Gardenia jasminoides* apresenta uma atividade contra a pancreatite aguda grave pela redução da amilase sérica, da atividade da mieloperoxidase sérica e tecidual, TNF- α e IL-6 séricos e da injúria provocada pelos radicais livres de oxigênio, óxido nítrico e endotoxinas (MAO et al., 2003; WANG et al., 2003). JUNG et al. (2008) mostraram que o extrato dessa planta diminui significativamente a severidade da PA associada à injúria pulmonar, evidenciado pela redução do edema pancreático, infiltração neutrofílica, níveis séricos de amilase, lipase e de citocinas.
- ❖ O resveratrol, polifenol encontrado na casca da semente da uva preta, que possui atividade antioxidante e antiinflamatória, mostrou ação protetora do dano cerebral induzido pela pancreatite aguda severa e na pancreatite experimental induzida por colecistocinina e ter-butil-hidroperóxido em ratos, reduzindo as alterações histopatológicas pancreáticas, inibindo a ativação do NF- κ B e reduzindo os níveis pancreáticos de TNF- α . (JHA et al., 2009; LAWINSKI et al., 2005; SZABOLCS et al., 2006b).
- ❖ A preparação chinesa Qing Yi Tang melhora a motilidade do trato gastrointestinal, através da estimulação da atividade mioelétrica, na pancreatite induzida por ceruleína e deoxicolato de sódio em animais experimentais (LI et al., 2007).
- ❖ *Hyericum perforatum*, planta medicinal que contém vários compostos polifenólicos, como flavonóides e ácidos fenólicos, atenua a pancreatite

induzida por ceruleína em camundongos, reduzindo as alterações histopatológicas pancreáticas, a expressão de ICAM-1 e a atividade da mieloperoxidase (GENOVESE et al., 2006b).

- ❖ *Patrinia scabiosaefolia*, planta da medicina tradicional oriental, usada popularmente no tratamento de várias doenças como edema, apendicite, endometriose e inflamação, demonstrou ação protetora na pancreatite induzida por colecistocinina em ratos (SEO et al., 2006).
- ❖ Ácido beta-ursólico isolado de *Salvia officinales*, inibe proteases in vitro (tripsina, trombina e uroquinase). As proteases exercem um papel regulatório em uma variedade de patologias, incluindo a pancreatite (JEDINÁK et al., 2006).
- ❖ *Taraxacum officinale*, que possui atividade antiinflamatória, tem ação protetora na pancreatite induzida por colecistocinina em ratos, reduzindo o edema pancreático, os níveis de IL-6 e TNF- α e aumentando os níveis de HSP60 e HSP72 (SEO et al., 2005).
- ❖ O extrato do chá preto apresenta importante atividade antioxidante. Em um modelo experimental de pancreatite em ratos induzida pela administração de colecistocinina associado a etanol foi observado que o extrato desse chá previne o desenvolvimento da doença devido o seu potencial antioxidante, antiinflamatório e antiapoptótico (DOLAN et al., 2005).
- ❖ O extrato de “grapefruit” (pomelo ou toranja) que possui atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante, pela presença de naringenina, um flavonóide citoprotetor, reduziu a pancreatite induzida por isquemia de reperfusão em ratos, provavelmente por mecanismo antioxidante (DEMBINSKI et al., 2004).
- ❖ O extrato padronizado de *Gingko biloba* (Egb761) exerce ação protetora em modelo de pancreatite induzida por taurocolato de sódio em ratos,

possivelmente por ação antioxidante, reduzindo os níveis séricos de amilase e lipase e as alterações histopatológicas (ZEYBEK et al., 2003).

- ❖ Ruibarbo apresenta efeitos protetores contra a pancreatite aguda. Redução da amilase e lipase sérica, melhora dos sintomas da dor abdominal e da microcirculação, redução dos níveis plasmáticos de TNF- α e IL-6, inibição da ativação excessiva de macrófagos e infiltração de neutrófilos e redução da produção de radicais livres de oxigênio são alguns de seus efeitos (ZHANG et al., 2005 e ZHAO et al., 2003).
- ❖ *Emblica officinalis*, planta prescrita na medicina Ayurvédica, tem ação protetora na pancreatite experimental em cães (THORAT et al., 1995).

1.3. *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March.

A família Burseraceae compreende 16 gêneros e mais de 800 espécies encontradas na região Amazônica, Piauí, Bahia, Minas Gerais, Goiás do Brasil e em países como Suriname, Colômbia, Venezuela e Paraguai. Dentre as espécies temos o *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March que é popularmente conhecido como almecegueira, breu-branco verdadeiro, almecegueira cheirosa, almecegueira de cheiro, almecegueira vermelha e almecegueiro bravo (CORRÊA, 1984).

O *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March é uma árvore de grande porte, com altura que varia de 10 a 20 metros (figura 5), com ocorrência em todo o Brasil, vegetando em terrenos arenosos, tanto úmidos quanto secos (CORRÊA, 1984). Esta espécie fornece madeira moderadamente pesada (densidade 0,77 g/cm³), compacta, dócil ao cepilho, bastante elástica e de grande durabilidade em lugares secos, sendo de excelente qualidade para a construção civil (LORENZI, 1992). Possuindo casca cinzenta, pouco espessa; folhas pinadas, com 2-3 jugos ou raras vezes 4, possuindo de 5 a 9 folíolos oblongos, comumente 7 (daí o nome da espécie) inteiros, glabros, de 10 cm de comprimentos e 5 cm de largura (figura 6); flores verdes amareladas, pequenas e abundantes, dispostas em panículas; fruto

com drupa vermelha, de forma ovóide, contendo polpa resinosa e amarela, envolvendo uma semente, ou raras vezes mais de uma, com até quatro (CORRÊA, 1984).

Do tronco da espécie *Protium heptaphyllum* March, quando lesionado, exsuda uma resina oleosa e amorfa rica em substâncias aromáticas, cujas aplicações gerais são: fabricações de vernizes e tintas, na calafetagem de embarcações, em rituais religiosos, em cosméticos, repelente de insetos e aromatizante de ambientes (figura 7). Em sua forma natural a resina é utilizada na medicina popular como antiinflamatório, gastroprotetor, analgésico, expectorante e cicatrizante de feridas (SIANI et al., 1999).

A partir de estudos químicos do óleo-resina proveniente de *P. heptaphyllum* foram caracterizados e isolados muitos constituintes. A resina da almécega é constituída por substâncias de natureza terpênica, sendo o óleo essencial rico em monoterpenóides e fenilpropanóides (BANDEIRA et al., 2001; SIANI et al., 1999 e ZOGHBI et al., 1995). Entre os constituintes fixos, a literatura registra a presença de um monoterpeno trioxigenado e quatro misturas binárias de triterpenóides (BANDEIRA et al., 2002; MAIA et al., 2000 e SUSSUNAGA et al., 2001), onde se destaca a mistura de α - e β - amirina (figura 8).

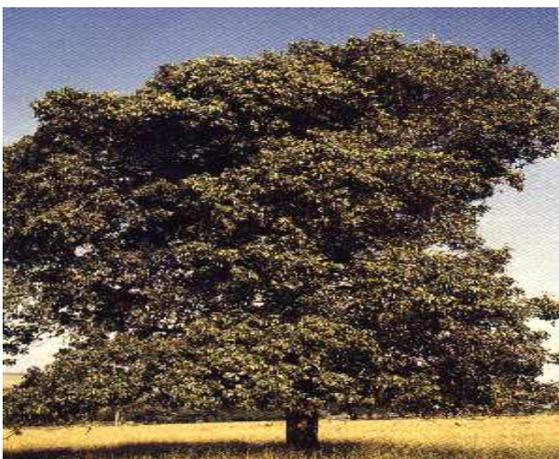


Figura 5. Fotografia da espécie *Protium heptaphyllum* March.

Figura 6. Fotografia ilustrando folhas e frutos do *Protium heptaphyllum*.



Figura 7. Fotografia ilustrando queima do exsudato óleo-resinoso do *Protium heptaphyllum*.

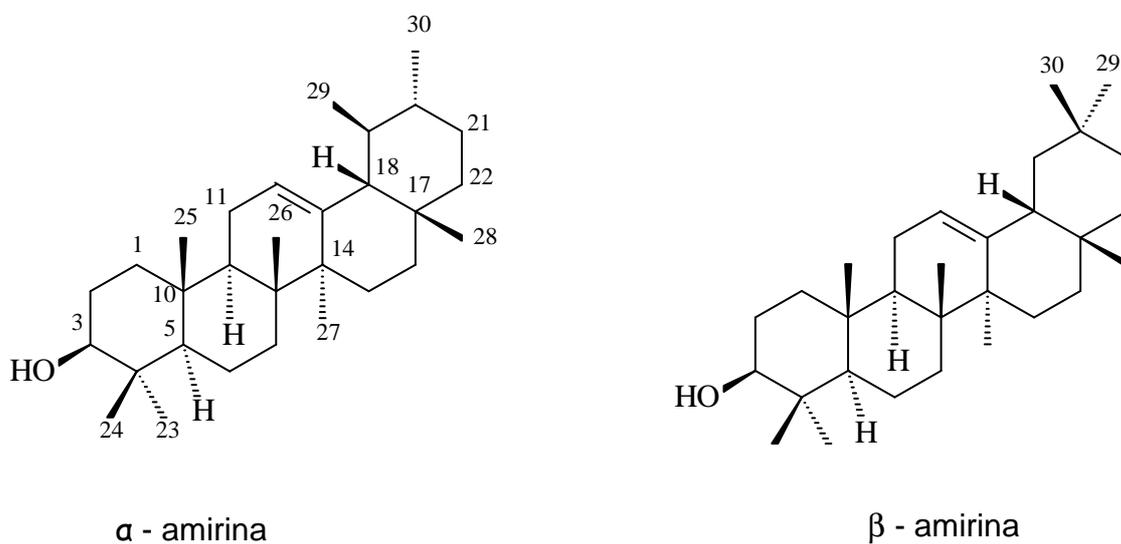


Figura 8. Estrutura química dos triterpenos pentacíclicos α - e β - amirina.

1.3.1. Alfa e Beta- amirina

A mistura de triterpenos pentacíclicos alfa e beta-amirina (α,β -amirina) é o constituinte majoritário da resina do *P. hepthaphyllum* (figura 8) (VIEIRA-JÚNIOR et al., 2005). Essa mistura de triterpenos pode ser encontrada em outras espécies vegetais como *Moldenhawera nutans* (VALE et al., 2005), *Achillea alexandri-regis* (KUNDAKOVIC et al., 2004), *Sideritis candicans Ait* (HERNANDEZ-PEREZ et al., 2004) e *Carmona retusa* (VILLASENOR et al., 2004).

Nosso laboratório mostrou que a mistura de α,β -amirina possui propriedades gastroprotetora (OLIVEIRA et al., 2004a), antipruriginosa (OLIVEIRA et al., 2004b), antinociceptiva visceral (LIMA-JÚNIOR et al., 2006), hepatoprotetora (OLIVEIRA et al., 2005), inibidora da expressão de receptor NK-1 em modelo de cistite hemorrágica (LIMA-JÚNIOR et al., 2007), antinociceptiva em dor orofacial em ratos (HOLANDA et al., 2008a) e antiinflamatória em modelo de periodontite em ratos (HOLANDA et al., 2008b).

Otuki et al. (2005a) demonstraram uma atividade antinociceptiva para a mistura de α,β -amirina, isolada do *Protium kleinii*, envolvendo a participação da proteína quinase C e proteína quinase A, e a atividade antiinflamatória tópica da α -amirina (OTUKI et al., 2005b). Medeiros et al. (2007) caracterizaram o mecanismo da atividade antiinflamatória tópica de α -amirina, que envolve a supressão de PGE₂ por mecanismos envolvendo a supressão da expressão de COX-2 e bloqueio da ativação de NF κ B. Aragão et al. (2004 e 2006) avaliaram uma atividade ansiolítica e antidepressiva e atividade antiagregante plaquetária da mistura de α,β -amirina. Kweifio-Okai et al. (1992) demonstraram atividade antilipoxigenase para esse composto. Vitor et al. (2009) estudaram uma atividade antiinflamatória da mistura de α,β -amirina em modelo de colite ulcerativa em ratos induzida por TNBS cujo mecanismo envolve a supressão de citocinas inflamatórias e COX-2, possivelmente pela inibição de NF- κ B.

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A incidência da pancreatite e a morbimortalidade associada à doença demanda uma atenção sobre o problema. A patogênese da pancreatite aguda é multifatorial e uma interação entre citocinas, mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio contribui para a amplificação da cascata inflamatória não-controlada (PEREDA et al., 2006). Até o momento não existe um tratamento eficaz para a doença, os objetivos da terapêutica clínica incluem o controle da dor, medidas de suporte, suprir necessidades nutricionais, monitorar as complicações, prevenir a infecção pancreática e a necrose pancreática (CARROLL et al., 2007).

Plantas medicinais e seus princípios ativos que possuem atividade antiinflamatória e/ou antioxidante demonstraram ação protetora em modelos animais de pancreatite. A mistura de terpenos α,β -amirina, isolada do *P. heptaphyllum*, demonstrou várias ações biológicas como gastroproteção, ação antipruriginosa, antinociceptiva e hepatoprotetora (OLIVEIRA et al., 2004a,b; OLIVEIRA et al., 2005; OTUKI et al. 2005a,b; LIMA-JÚNIOR, 2006; MEDEIROS et al., 2007; HOLANDA et al., 2008a,b). Muitos triterpenóides com atividade antiinflamatória, derivados de plantas, incluindo derivados do oleanano e ursano foram descritos por atuar como inibidores competitivos de serina proteases, tripsina e quimiotripsina, que apresenta um papel chave no desenvolvimento da pancreatite aguda (RAJIC et al., 2001; GRANGER & REMICK, 2005). Efeito esse que pode também estar envolvido na atividade de α,β - amirina no modelo de PA, uma vez que essa mistura de triterpenos apresenta semelhança estrutural aos triterpenos oleanano e ursano.

Portanto, esta pesquisa justifica-se pelos seguintes argumentos:

- ❖ A incidência elevada da pancreatite aguda na população e a mortalidade associada à doença.
- ❖ A inexistência, até o momento, de um tratamento eficaz para a doença e a necessidade de se buscar novas opções terapêuticas, com qualidade, eficácia e segurança comprovadas.

- ❖ A demonstração da atividade protetora pancreática de plantas medicinais e de seus princípios ativos em modelos experimentais de pancreatite aguda.
- ❖ As atividades farmacológicas (atividade antiinflamatória, citoprotetora, antinociceptiva e inibidora da expressão de NK-1r) apresentadas pela mistura de terpenos α,β -amirina isolada do *P. hepthaphyllum*.
- ❖ As atividades de triterpenóides no modelo de PA, oleanano e ursano, com semelhança estrutural à mistura de α,β -amirina.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

O *Protium heptaphyllum* produz uma resina rica em triterpenos pentacíclicos, como a mistura de α,β -amirina, substância de comprovadas atividades antiinflamatória, gastroprotetora, antitumoral, antinociceptiva, antiprurritogênica, hepatoprotetora, antilipoxigenase e antiagregante plaquetária. Uma vez que não existem relatos sobre a atividade da mistura de α,β -amirina sobre a pancreatite, e que esta é uma doença com um alto índice de morbimortalidade, esse trabalho teve como objetivo geral o estudo do efeito farmacológico da α,β -amirina na pancreatite aguda experimental.

3.2. Específicos

- ❖ Investigar o efeito de α,β -amirina na PA induzida por L-arginina em ratos e ceruleína em camundongos, analisando parâmetros bioquímicos séricos (amilase e lipase) e pancreáticos (mieloperoxidase, peroxidação lipídica e nitrato/nitrito) e edema pancreático;
- ❖ Avaliar o efeito de α,β -amirina na PA induzida por L-arginina em ratos e ceruleína em camundongos através de análise histopatológica, medida de citocinas séricas por ELISA (TNF- α e IL-6) e imunomarcação para TNF- α , iNOS, e nitrotirosina em tecido pancreático.

4. MATERIAIS

4.1. Material botânico

A resina da almécega (*Protium heptaphyllum* March) foi adquirida no Mercado Central de Teresina – PI, proveniente de um almecegal existente no município de Timom – MA. A espécie vegetal foi coletada nesse local e identificada no Herbário Graziela Barroso e registrada a exsicata com o Nº. 18.247. O material de estudo, a mistura de triterpenos α,β -amirina, foi extraída a partir da resina de *P. heptaphyllum* pela Profa. Dra. Mariana Helena Chaves no Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí.

4.2. Animais experimentais

Foram utilizados para a realização desse estudo ratos Wistar machos, pesando entre 200 – 250 gramas e camundongos albinos Swiss, adultos, machos, pesando entre 25 - 30 gramas. Todos os animais utilizados foram provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Biotério Central da UFC, mantidos em caixas de prolipropileno, à temperatura média de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ em ciclos de claro-escuro de 12/12 h, recebendo ração padrão e água à vontade. Os animais foram habituados para o teste 2 horas antes da experimentação.

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo CEPA (Comitê de Ética na Pesquisa Animal) desta Universidade (números de protocolo: 41/2008 e 85/2008).

4.3. Drogas e reagentes

PRODUTO	ORIGEM
Tween 80	Sigma, USA
L-arginina	Sigma, USA
Ceruleína	Sigma, USA
Metilprednisolona	Biolab, Brasil
Talidomida	FUNED, Brasil
Kit para determinação de Amilase	Labtest, Brasil
Kit para determinação de lipase	Bioclin, Brasil
Brometo de hexadecilmetilamônio	Sigma, USA
diidrocloreto de o-dianisidine	Sigma, USA
Diidrocloreto de N-1-(naftil)- etilenodiamina	Sigma-Aldrich, Brasil
Sulfanilamida	Sigma-Aldrich, Brasil
Ácido tiobarbitúrico	Sigma-Aldrich, Brasil
Kit Elisa para determinação de TNF- α	Quantikine®, R&D Systems, USA
Kit Elisa para determinação de IL-6	Quantikine®, R&D Systems, USA
Peróxido de hidrogênio	Sigma, USA
Anticorpo primário anti-TNF- α anti- mouse	Sigma-Aldrich, Brasil
Anticorpo primário anti-óxido nítrico sintase induzida anti-mouse	Sigma-Aldrich, Brasil
Anticorpo primário anti-nitrotirosina anti-mouse	Sigma-Aldrich, Brasil
Meio de montagem	Sigma, USA
DAB	DakoCytomation , USA
EnVisionTM/AP K1396 kit	DakoCytomation , USA

4.4. Equipamentos

EQUIPAMENTOS	ORIGEM
Balança para animais (mod. MF-6)	Filizola, Brasil
Balança analítica (mod. AX-200)	Shimadzu, Japão
Centrífuga refrigerada (0206281)	Cientec CT 5500 DR
Material cirúrgico	-
Espectrofotômetro	Bayer-RA 50
Leitor de placas (mod. DTX 880)	Backman Coulter
Micropipetas	Biohit
Micrótomo	-
Microscópio eletrônico	Nikon
Pipetas automáticas	Jecons

5. MÉTODOS

5.1. Obtenção da mistura dos triterpenos α,β -amirina (extração e fracionamento)

O material vegetal (410 g) foi dissolvido em metanol/diclorometano (4:1), filtrado e o solvente concentrado, obtendo-se 408 g da resina. A resina (12 g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica (280 g), empacotada com hexano, utilizando como eluente hexano e acetato de etila, em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 104 frações, de aproximadamente 125 mL, as quais foram concentradas em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, e analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa de gel de sílica. A fração M-19 (5,43 g), eluída em hexano-AcOEt (9:1), foi submetidas à caracterização, utilizando técnicas espectroscópicas (RMN ^1H e ^{13}C -BB 1HD, e DEPT 135°) e de análise térmica (TG e DSC). A metodologia de extração, fracionamento e caracterização dos componentes da fração M-19 (figura 9) foram realizados pela Profa. Dra. Mariana Helena Chaves do Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí.

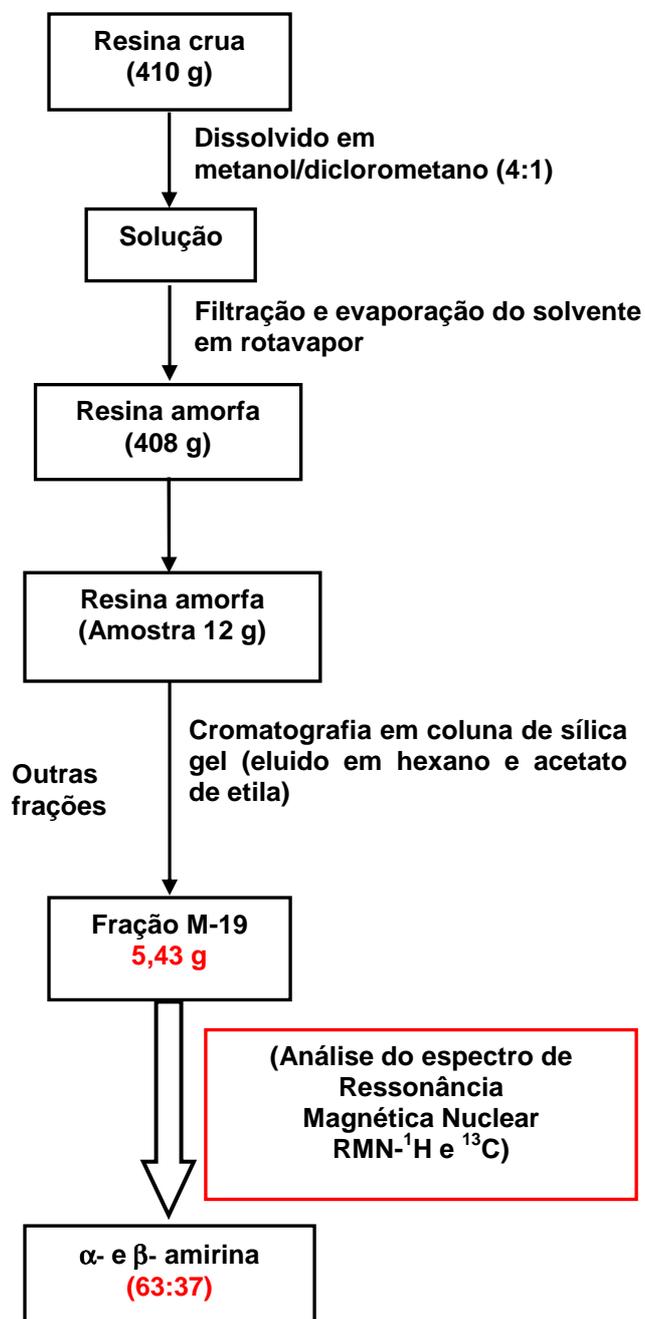


Figura 9. Processo de isolamento da mistura dos triterpenos α , β - amirina da resina de *Protium heptaphyllum*.

5.2. Caracterização da atividade da mistura de α,β -amirina na pancreatite aguda induzida pela administração de L-arginina em ratos e ceruleína em camundongos

5.2.1. Pancreatite aguda induzida por L-arginina

Ratos Wistar machos (n=6 por grupo) foram tratados oralmente com o veículo (2% Tween 80 em água destilada, 10 ml/kg) ou com α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg), 48, 24 e 1,5 h antes da administração intraperitoneal de L-arginina (L-arg, 2 X 2,5 g/kg, suspensa em solução salina) no intervalo de 1h (WICK et al., 2006). Um grupo que recebeu somente salina, i.p., foi incluído no estudo. Metilprednisolona (METILPRED, 30 mg/kg, i.m.) foi administrada 30 min antes da primeira injeção de L-arg. Após 24 h da última injeção de L-arginina todos os animais foram sacrificados. Os ratos foram anestesiados com éter e amostras de sangue foram coletadas através da punção venosa do plexo orbital, posteriormente os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para a retirada de amostras da cabeça do pâncreas. Em seguida foram determinados os parâmetros que compõem parte dos objetivos experimentais desse estudo.

5.2.2. Pancreatite aguda induzida por ceruleína

Camundongos Swiss machos (n=8 por grupo) foram tratados oralmente com o veículo (2% Tween 80 em água destilada, 10 ml/kg), ou com α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg), 48, 24 e 1,5 h antes da administração intraperitoneal (i.p.) de ceruleína (5 X 50 μ g/kg, suspensa em solução salina) no intervalo de 1h (MALLEO et al., 2008). Um grupo que recebeu apenas salina, i.p., foi incluído no estudo. Talidomida (200 mg/kg, v.o.) foi administrada 1h antes da primeira injeção de ceruleína. Os camundongos foram anestesiados com éter e amostras de sangue foram coletadas através da punção venosa do plexo orbital, posteriormente os

animais foram sacrificados por deslocamento cervical para a retirada de amostras da cabeça do pâncreas. Em seguida foram determinados os parâmetros que compõem parte dos objetivos experimentais desse estudo.

5.2.3. Determinação de amilase e lipase sérica

As 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. A análise foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

5.2.4. Determinação do grau de edema pancreático

O método descrito por Szabolcs et al. (2006) foi seguido. Após 24 h da última injeção de L-arginina ou ceruleína os animais foram pesados, sacrificados por deslocamento cervical e o pâncreas foi em seguida removido e pesado. A relação entre o peso do pâncreas (mg) e o peso corpóreo do animal (g) foi indicativa de edema pancreático (mg/g).

5.2.5. Determinação da atividade da mieloperoxidase

Amostras da cabeça do pâncreas foram congeladas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em uma solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5 % (HTAB) em tampão fosfato 50 mM (HTAB, pH 6,0, 1mL para 50mg do tecido). O homogenato (10%) foi submetido a três ciclos de congelamento, 5 min (-70°C) e descongelamento (água a 37°C). As amostras foram então centrifugadas (4000 rpm, por 15 min, 4°C) para remover o material insolúvel. A MPO presente no

sobrenadante (0,1 mL) foi analisada espectrofotometricamente após adição de 2,9 mL de tampão fosfato (50 mM, pH 6,0) contendo 0,167 mg/mL de hidrocloreto de o-dianisidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. A absorbância a 470 nm foi medida nos tempos de 0 e 5 min (KRAWISZ et al., 1984).

5.2.6. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Essa técnica foi descrita por Ohkawa et al. (1979). Baseia-se na medida dos níveis de malonildialdeído (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 a 532 nm. O complexo formado por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é amplamente usado como biomarcadores de peroxidação lipídica em sistemas biológicos. Amostras do pâncreas dos animais foram retiradas, pesadas e homogeneizada 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, foram adicionados 1 mL de água destilada e 5 mL de n-butanol. Posteriormente, os tubos de ensaio foram fechados, agitados durante 1 min e, em seguida, os mesmos foram centrifugados a 1400g durante 10 min. A absorbância do sobrenadante foi medida a 532 nm.

5.2.7. Determinação de nitrato e nitrito

Essa determinação foi realizada apenas na pancreatite induzida por L-arg em ratos. O reagente de Griess (constituída de solução de sulfanilamida a 1% e solução de N-1-(naftil)-etilenodiamina a 0,1% na proporção de 1:1, ambas em ácido fosfórico a 5%) revela a presença de nitrito em amostras (urina, plasma,

homogenato tecidual) pela reação de diazotização que forma um cromóforo de cor rosa, com um pico de absorvância a 560 nm. Para a realização do teste foram utilizados 100 μ L do reagente de Griess e adicionados 100 μ L do sobrenadante (centrifugado) do homogenato do pâncreas dos ratos em KCl a 10% ou 100 μ L do padrão em diferentes concentrações. Para o branco foi utilizado 100 μ L do reagente de Griess e adicionados 100 μ L de KCl a 10%. A leitura da absorvância foi realizada a 560 nm e feita num leitor de placa. A leitura da absorvância do padrão (y) foi plotada contra a concentração de cada padrão (x), e foi determinada a equação da reta, que foi usada para determinar a concentração de nitrato e nitrito em cada amostra (GREEN et al., 1981).

5.2.8. Determinação sérica de TNF- α e IL-6

As determinações de TNF- α e IL-6 séricos foram realizadas 24 h após a última administração de L-arginina ou ceruleína. Amostras de sangue foram centrifugadas à 3000 g durante 10 min à 4° C. Os níveis de TNF- α e IL-6 foram medidos no sobrenadante através da utilização do kit comercial para a determinação de TNF- α ou IL-6. As determinações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante.

5.2.9. Avaliação histológica do pâncreas

Amostras da cabeça do pâncreas foram retiradas 24 h após a última injeção de L-arginina ou ceruleína, fixadas em formol a 10%, embebidas em parafina por métodos padronizados, cortados em seções de 5 μ m, com auxílio de um micrótomo, corados com hematoxilina-eosina, avaliadas sob microscopia pela Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito que não tinha conhecimento da identidade da amostra. As alterações morfológicas características de pancreatite avaliadas foram edema, infiltração inflamatória, vacuolização, necrose e hemorragia. O grau de

edema foi determinado utilizando uma escala de 0 a 3 (0= ausente, 1 = edema interlobular, 2= edema interlobular e moderado edema intralobular, e 3 = edema interlobular e severo edema intralobular), a presença de infiltrado inflamatório foi também analisada obedecendo uma grade de 0 a 3 (0= ausente 1= infiltração perivascular escassa, 2= moderada infiltração perivascular e escassa infiltração difusa, e 3 = abundante infiltração difusa), O grau de vacuolização foi baseado na porcentagem apropriada de células acinares envolvidas: 0= ausente, 1= menos do que 25%, 2= entre 25 e 50%, e 3= mais do que 50% das células acinares. A necrose foi analisada pela atribuição de escores de 0 a 3 (0= ausente, 1= menos do que 15% de células pancreáticas envolvidas, 2= de 15 a 35% das células pancreáticas envolvidas, e 3= mais do que 35% de células envolvidas. Para a avaliação da hemorragia, seguiu-se com a atribuição de escores: 0= ausente, 1= de 1 a 2 focus hemorrágicos por lâmina, 2= de 3 a 5 focus hemorrágicos por lâmina, 3= mais do que 5 focus hemorrágicos por lâmina (DEMBINSKI et al., 2008).

5.2.10. Estudo imunohistoquímico para a determinação de TNF- α , iNOS e nitrotirosina

As amostras de pâncreas foram fixadas em solução tamponada de formaldeído a 10%, durante 24 h e processadas em parafina e cortes (5 μ m) seriados foram feitos em lâminas gelatinizadas. As lâminas foram inicialmente desparafinizadas e as ligações proteicas não específicas foram bloqueadas pela incubação do tecido com soro de cabra diluído numa proporção de 0,5% em PBS por 45 min. As lâminas foram em seguida lavadas 3 vezes com PBS por 10 min cada. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário anti-TNF- α anti-mouse, anti-óxido nítrico sintase induzida anti-mouse ou anti-nitrotirosina anti-mouse (determinado apenas para a pancreatite aguda induzida por L-arg em ratos) por 12 h à 4°C diluído numa proporção de 1:400 em PBS contendo albumina sérica bovina. As lâminas foram cuidadosamente lavadas 3 vezes com PBS (pH=7,4) por 5 min. As lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina (30 min) seguida pela aplicação de uma solução contendo levamisol e o

substrato Fast Red, ou as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotinilado (40 min), seguida pela aplicação de estreptavidina peroxidase (30 min) e aplicação de solução de DAB (solução substrato cromógeno) para a obtenção de uma coloração marrom, em seguida foi feita uma contra-coloração com hematoxilina de Harry. Posteriormente, as lâminas foram lavadas cuidadosamente com água destilada, secadas, montadas com o meio de montagem e avaliadas quantitativamente através da atribuição de escores de acordo com a intensidade da reação observada nas lâminas pela Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito. Intensidade de reação ausente (0), leve (1), moderada (2), forte (3), coloração intensa (4) (LIMA, 2004).

5.3. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (erro padrão da média). Para a comparação múltipla dos dados paramétricos, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA), e o nível de significância entre os grupos foi determinado pelo teste de Student Newman Keul.

Para as análises histológicas e imunohistoquímicas os valores foram expressos como a mediana dos escores, acompanhado pelos valores mínimo e máximo. Para comparação múltipla dos dados não paramétricos, foi utilizado o Teste de Kruskal Wallis, e o nível de significância entre os grupos foi determinado pelo teste de Dunns.

Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6. RESULTADOS

6.1. Obtenção da mistura dos triterpenos α,β -amirina (identificação)

O espectro de RMN ^1H da fração M-19 apresentou um duplo dubleto em δ 3,22 ($J=5$ e 11 Hz), característico de triterpenóides do tipo $3\beta\text{-OH}$ e dois tripletos em δ 5,15 e 5,20, correspondentes à CH de olefinas. Esta análise foi confirmada pelos espectros de RMN ^{13}C – BB e DEPT 135° . A comparação dos resultados obtidos com os relatados na literatura permitiu identificar os triterpenóides α -amirina e β -amirina (Figura 8), na razão de 63:37, determinada por comparação dos valores da integração dos sinais da região de olefinas (δ 5,15 e 5,20) e do hidrogênio em carbono carbinólico (δ 3,22; H-3), no espectro de RMN ^1H . Considerando-se que foram obtidos, após fracionamento cromatográfico, 5,43 g (45,3%) da mistura de α -amirina e β -amirina, bem como a proporção entre elas, constatou-se que 28,3% (3,43 g) da resina corresponde à α -amirina e 16,6% (2,0 g) à β -amirina (Figura 9).

6.2. Pancreatite aguda induzida por L-arginina e ceruleína

A administração de L-arginina em ratos e ceruleína em camundongos foi responsável pelo desenvolvimento de pancreatite aguda evidenciado por aumento de parâmetros bioquímicos séricos (amilase, lipase), pancreáticos (mieloperoxidase, peroxidação lipídica e nitrato/nitrito) e edema pancreático, assim como através de análise histopatológica, medida de citocinas séricas por ELISA (TNF- α e IL-6) e imunomarcagem para TNF- α , iNOS, e nitrotirosina em tecido pancreático.

6.3. Caracterização da atividade da mistura de α,β -amirina na pancreatite aguda induzida pela administração de L-arginina em ratos

6.3.1. Determinação de amilase sérica

α,β -amirina 10, 30 e 100 mg/kg, v.o., reduziu ($p < 0,001$) a amilase sérica para $2759 \pm 70,8$; $2550 \pm 29,0$ e $2381 \pm 56,6$ U/dL (redução de 10; 17 e 22%), respectivamente, quando comparado ao grupo L-arg ($3070 \pm 20,5$ U/dL). METILPRED (30 mg/kg, i.m.), antiinflamatório esteroidal, controle positivo, reduziu os níveis da amilase para $2692 \pm 75,4$ U/dL ($p < 0,001$), 12% de redução (Figura 10).

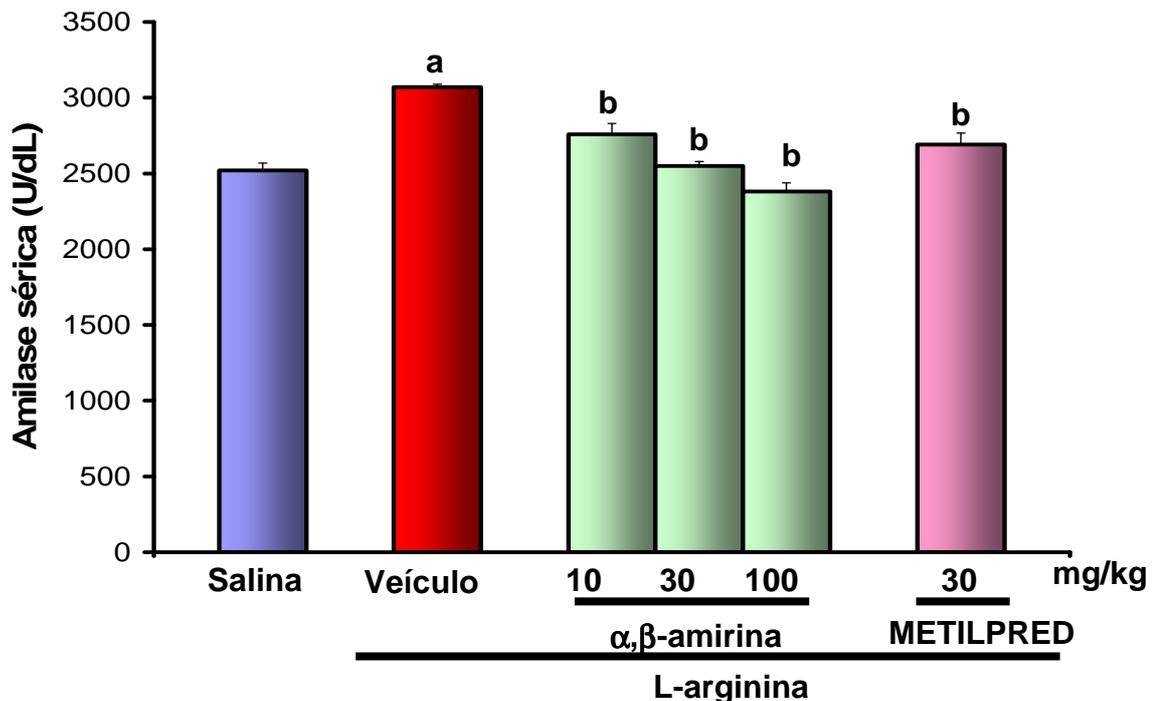


Figura 10. Efeito de α,β -amirina e METILPRED sobre os níveis de amilase sérica em resposta a administração de L-arg em ratos. Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração i.p. de L-arg (2 X 2,5 g/kg; 1h de intervalo). METILPRED (30 mg/kg, i.m.) foi administrada 30 min antes de L-arg. Um grupo que recebeu salina i.p. foi incluído. Os valores representam a média \pm E.P.M. dos níveis de amilase (U/dL). Foram utilizados 6 animais por grupo. ^a $p < 0,001$ vs salina; ^b $p < 0,001$ vs L-arg (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.3.2. Determinação de lipase sérica

A mistura de α,β -amirina nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, v.o., reduziu ($p < 0,001$) o aumento da lipase sérica de $82,2 \pm 11,7$ U/L (L-arg) para $35,7 \pm 3,8$; $32,3 \pm 2,7$ e $25,5 \pm 0,7$ U/L (redução de 56; 61 e 69%) respectivamente. METILPRED (30 mg/kg, i.m.) reduziu significativamente ($p < 0,001$) os níveis séricos da lipase de $82,2 \pm 11,7$ U/L (L-arg) para $23,3 \pm 3,9$ U/L, mostrando uma redução de 72% da lipase sérica (Figura 11).

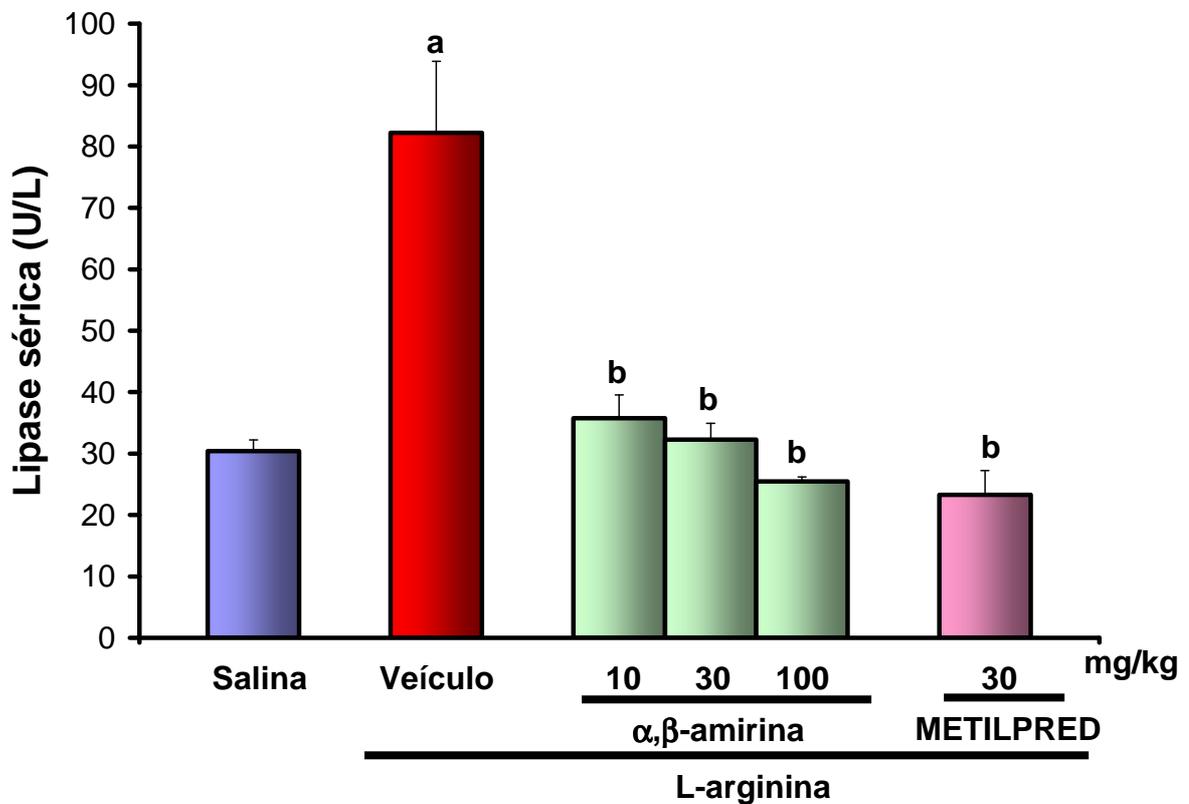


Figura 11. Efeito de α,β -amirina e METILPRED sobre os níveis de lipase sérica em resposta a administração de L-arg em ratos. Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração i.p. de L-arg (2 X 2,5 g/kg; 1 h de intervalo). METILPRED (30 mg/kg, i.m.) foi administrada 30 min antes da primeira injeção de L-arg. Um grupo que recebeu apenas salina i.p. foi incluído no estudo. Os valores representam a média \pm E.P.M. dos níveis séricos de lipase (U/L). Foram utilizados 6 animais por grupo. ^a $p < 0,001$ vs salina; ^b $p < 0,001$ vs L-arg (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.3.3. Determinação do grau de edema pancreático

Os valores do edema para a mistura de α,β -amirina nas doses 10, 30 e 100 mg/kg foi de $4,5 \pm 0,1$; $3,4 \pm 0,2$ e $2,9 \pm 0,1$ mg/g, respectivamente. Para o grupo da L-arg o edema foi de $4,7 \pm 0,3$ mg/g. Apenas as doses de 30 e 100 mg/kg de α,β -amirina reduziram significativamente o edema pancreático, em 28 e 36%, respectivamente. METILPRED (30 mg/kg, i.m.) reduziu significativamente ($p < 0,001$) o edema pancreático de $4,7 \pm 0,3$ mg/g (L-arg) para $3,0 \pm 0,2$ mg/g, mostrando uma redução de 35% do edema (Figura 12).

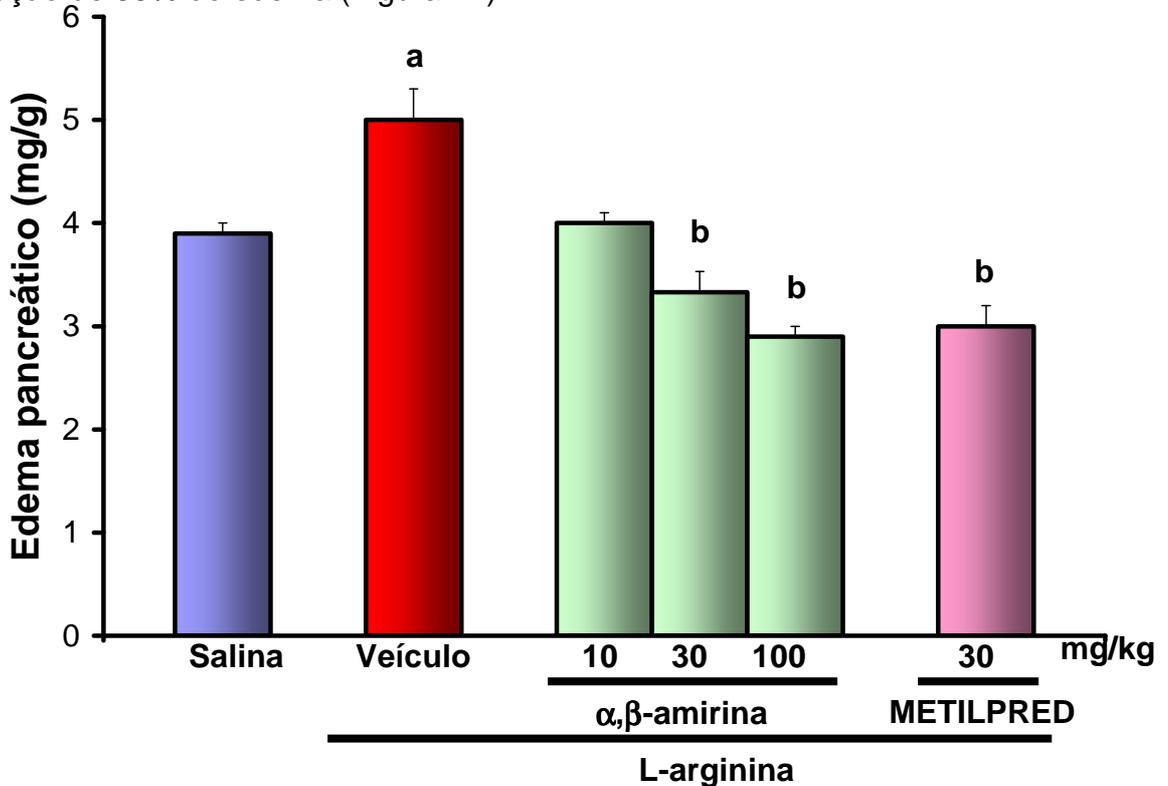


Figura 12. Efeito de α,β -amirina e METILPRED sobre o edema pancreático em resposta a administração de L-arg em ratos. Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração i.p. de L-arg (2 X 2,5 g/kg; 1 h de intervalo). METILPRED (30 mg/kg, i.m.) foi administrada 30 min antes da primeira injeção de L-arginina. Um grupo que recebeu apenas salina i.p. foi incluído no estudo. Os valores representam a média \pm E.P.M. da relação entre o peso do pâncreas e o peso do animal (mg/g). Foram utilizados 6 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs salina; ^b $p < 0,001$ vs L-arg (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.3.4. Determinação da atividade da mieloperoxidase

A mistura de α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg v.o.) reduziu ($p < 0,05$) o aumento da atividade de MPO induzida por L-arg de $0,05 \pm 0,002$ (Abs. 470nm) para $0,04 \pm 0,005$; $0,03 \pm 0,005$ e $0,03 \pm 0,001$ (Abs. 470nm) (redução de 27; 38 e 40% respectivamente). METILPRED (30 mg/kg, i.m.) reduziu ($p < 0,05$) o aumento da atividade de MPO para $0,03 \pm 0,007$ (Abs. 470nm), mostrando uma redução de 34% do aumento da atividade de MPO (Figura 13).

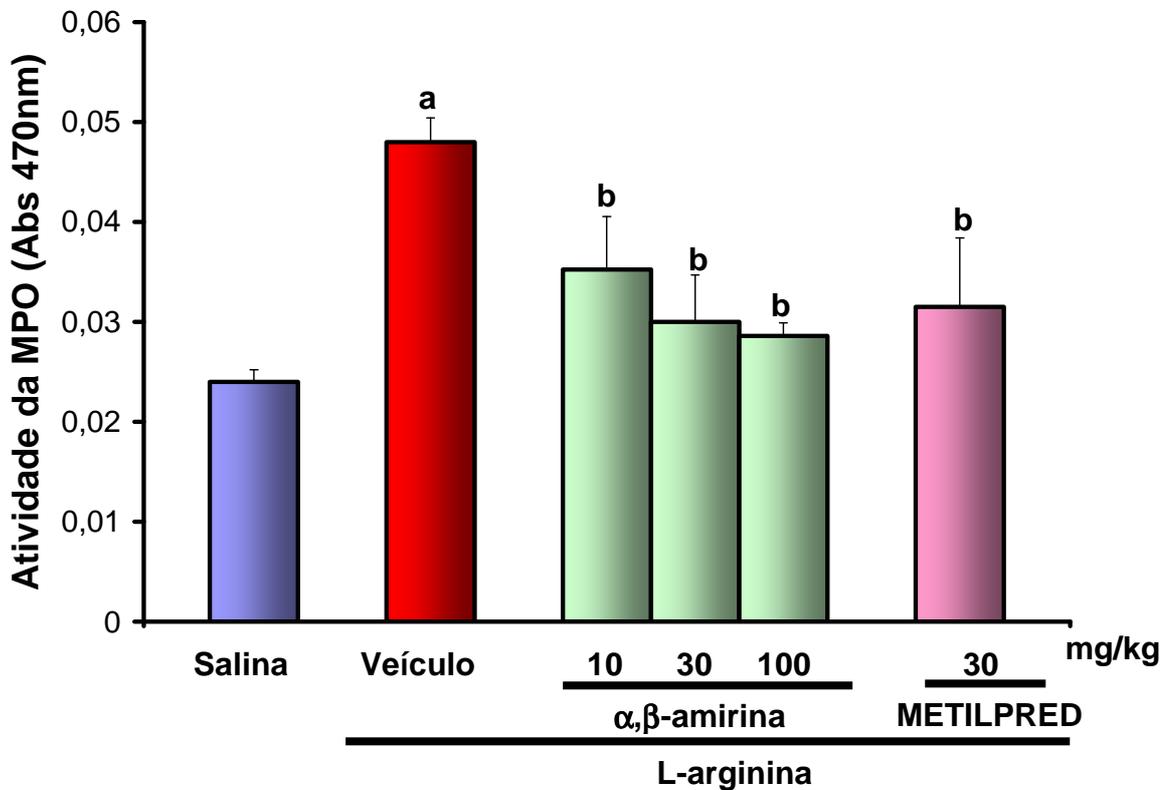


Figura 13. Efeito de α,β -amirina e METILPRED sobre o aumento da atividade de MPO em resposta a administração de L-arg em ratos. Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração i.p. de L-arg (2 X 2,5 g/kg; 1 h de intervalo). METILPRED (30 mg/kg, i.m.) foi administrada 30 min antes da primeira injeção de L-arginina. Um grupo que recebeu apenas salina i.p. foi incluído no estudo. Os valores representam a média \pm E.P.M. da atividade de MPO (Abs. 470nm). Foram utilizados 6 animais por grupo. ^a $p < 0,001$ vs salina; ^b $p < 0,05$ vs L-arg (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.3.5. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

A mistura de α,β -amirina nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, v.o., reduziu de maneira significativa ($p < 0,001$) o aumento da quantidade de TBARS de $27,7 \pm 1,6$ μM para $14,9 \pm 1,4$; $16,5 \pm 2,6$ e $12,2 \pm 1,9$ μM (redução de 46; 40 e 56%) respectivamente. METILPRED (30 mg/kg, i.m.) reduziu significativamente ($p < 0,001$) o aumento da quantidade de TBARS de $27,7 \pm 1,6$ μM (L-arg) para $4,0 \pm 0,3$ μM , mostrando uma redução de 86% do aumento de TBARS (Figura 14).

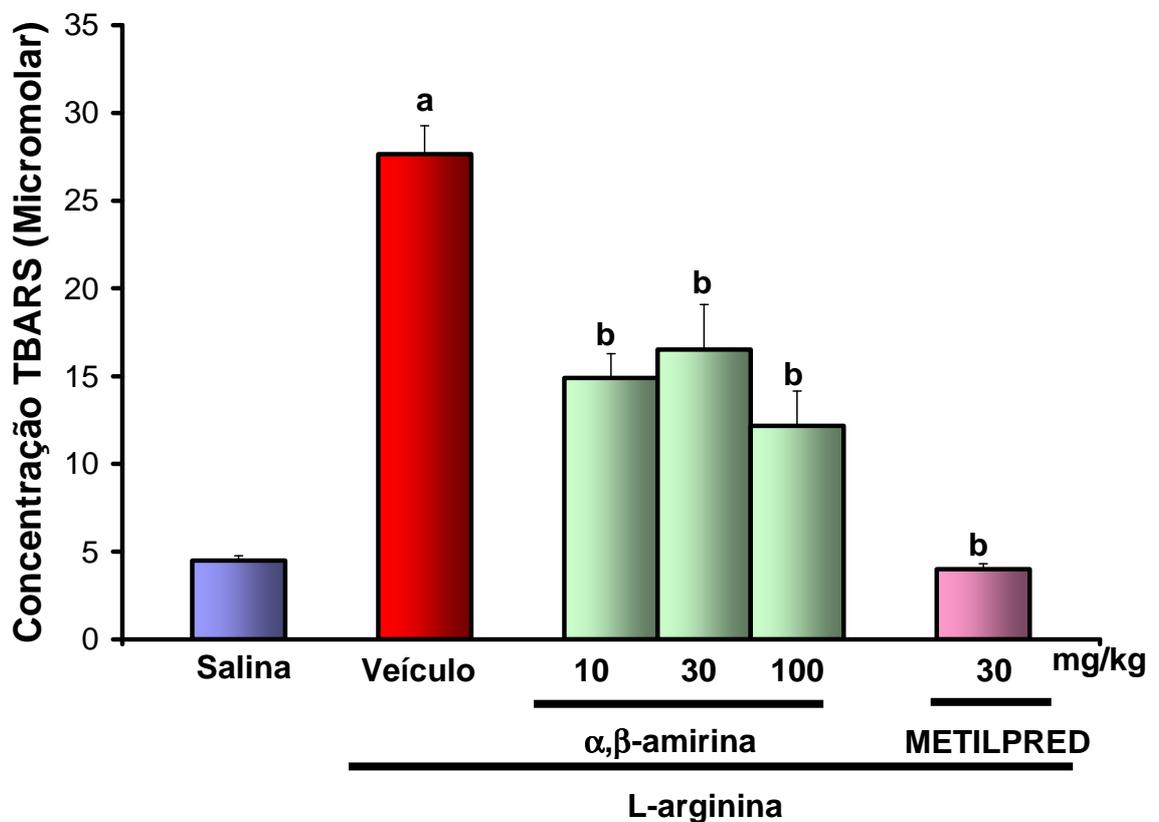


Figura 14. Efeito de α,β -amirina e METILPRED sobre o aumento de TBARS em resposta a administração de L-arg em ratos. Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração i.p. de L-arg (2 X 2,5 g/kg; 1 h de intervalo). METILPRED (30 mg/kg, i.m.) foi administrada 30 min antes da primeira injeção de L-arg. Um grupo que recebeu apenas salina i.p. foi incluído no estudo. Os valores representam a média \pm E.P.M. da quantidade de TBARS (μM). Foram utilizados 6 animais por grupo. ^a $p < 0,001$ vs salina; ^b $p < 0,001$ vs L-arg (ANOVA e teste de Student-Newman-Keul).

6.3.6. Determinação de nitrato e nitrito

A mistura de α,β -amirina nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg v.o. reduziu de maneira significativa ($p<0,05$) o aumento de nitrato e nitrito no homogenato tecidual de $0,9 \pm 0,08 \mu\text{M}$ (L-arg) para $0,6 \pm 0,02$; $0,6 \pm 0,07$ e $0,5 \pm 0,12 \mu\text{M}$ (redução de 29; 38 e 47%) respectivamente. METILPRED (30 mg/kg, i.m.) reduziu significativamente ($p<0,05$) os níveis de nitrato e nitrito $0,9 \pm 0,08 \mu\text{M}$ (L-arg) para $0,6 \pm 0,06 \mu\text{M}$, mostrando uma redução de 28% dos níveis de nitrato e nitrito (Figura 15).

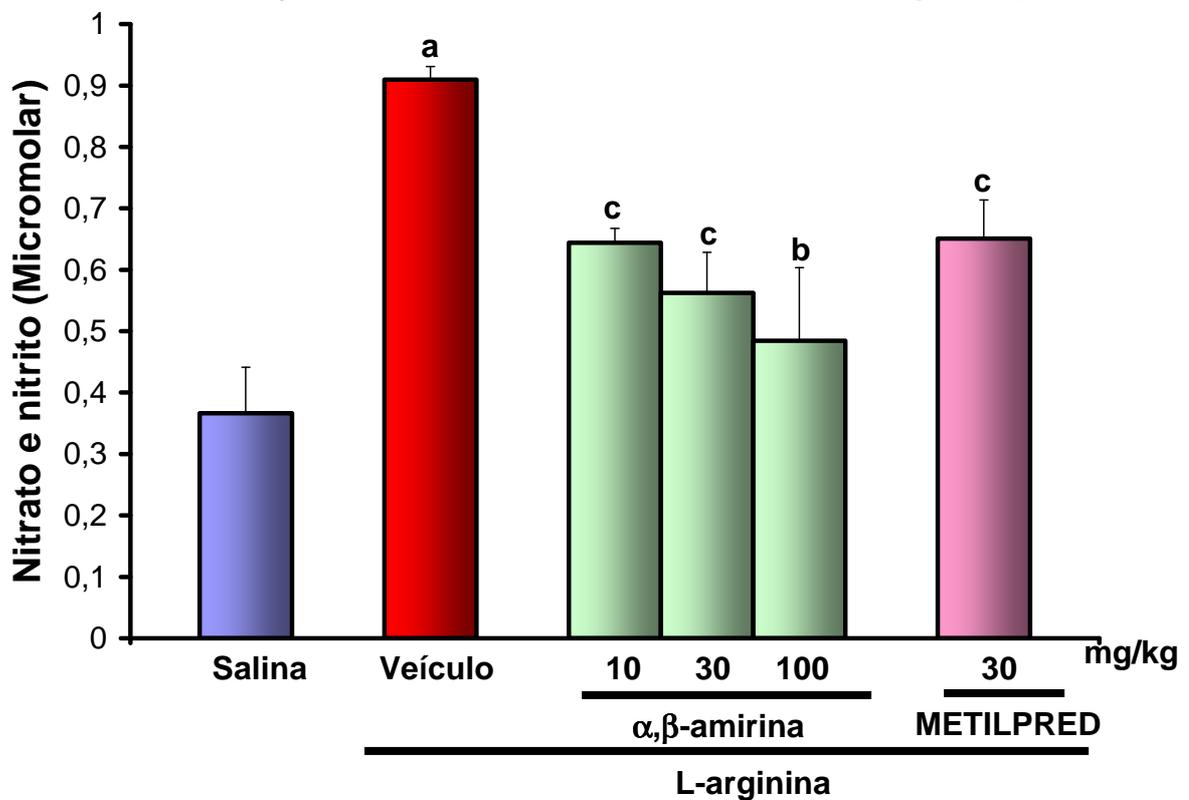


Figura 15. Efeito de α,β -amirina e METILPRED sobre o aumento dos níveis teciduais de nitrato e nitrito em resposta a administração de L-arg em ratos. Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração i.p. de L-arg (2 X 2,5 g/kg; 1 h de intervalo). METILPRED (30 mg/kg, i.m.) foi administrada 30 min antes da primeira injeção de L-arg. Um grupo que recebeu apenas salina i.p. foi incluído no estudo. Os valores representam a média \pm E.P.M. dos níveis teciduais de nitrato e nitrito (μM). Foram utilizados 6 animais por grupo. ^a $p<0,001$ vs salina; ^b $p<0,01$ vs L-arg; ^c $p<0,05$ vs L-arg (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.3.7. Determinação sérica de TNF- α

A mistura de α,β -amirina apenas nas doses 30 e 100 mg/kg v.o. reduziram significativamente ($p < 0,05$) os níveis de TNF- α de $24,4 \pm 3,4$ pg/mL (L-arg) para $17,2 \pm 1,1$ e $17,6 \pm 0,9$ pg/mL (redução de 29 e 28%) respectivamente. METILPRED (30 mg/kg, i.m.) reduziu significativamente ($p < 0,05$) os níveis de TNF- α sérico de $24,4 \pm 3,4$ pg/mL (L-arg) para $17,9 \pm 1,4$, mostrando uma redução de 26% dos níveis de TNF- α (Figura 16).

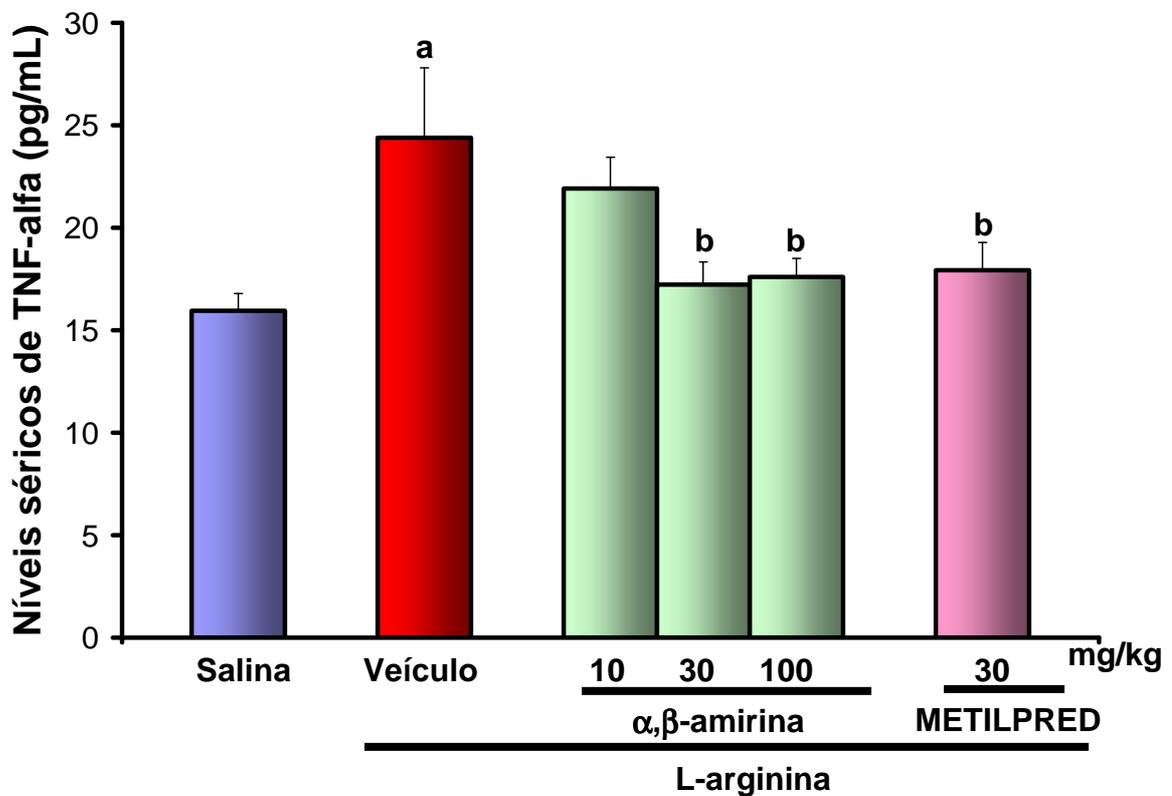


Figura 16. Efeito de α,β -amirina e METILPRED sobre os níveis séricos de TNF- α em resposta a administração de L-arg em ratos. Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração i.p. de L-arg (2 X 2,5 g/kg; 1 h de intervalo). METILPRED (30 mg/kg, i.m.) foi administrada 30 min antes da primeira injeção de L-arg. Um grupo que recebeu apenas salina i.p. foi incluído no estudo. Os valores representam a média \pm E.P.M. dos níveis séricos de TNF- α . Foram utilizados 6 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs salina; ^b $p < 0,05$ vs L-arg (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.3.8. Determinação sérica de IL-6

A mistura de α,β -amirina nas doses 10, 30 e 100 mg/kg v.o. reduziu significativamente ($p < 0,05$) os níveis de IL-6 de $126,4 \pm 5,6$ pg/mL (L-arg) para $113,2 \pm 5,6$; $93,9 \pm 3,1$ e $93,4 \pm 2,1$ pg/mL (redução de 10; 26 e 26%) respectivamente. METILPRED (30 mg/kg, i.m.) reduziu significativamente ($p < 0,05$) os níveis de IL-6 sérico de $126,4 \pm 5,6$ pg/mL (L-arg) para $110,6 \pm 4,6$, mostrando um percentual de inibição de 12% dos níveis de IL-6 (Figura 17).

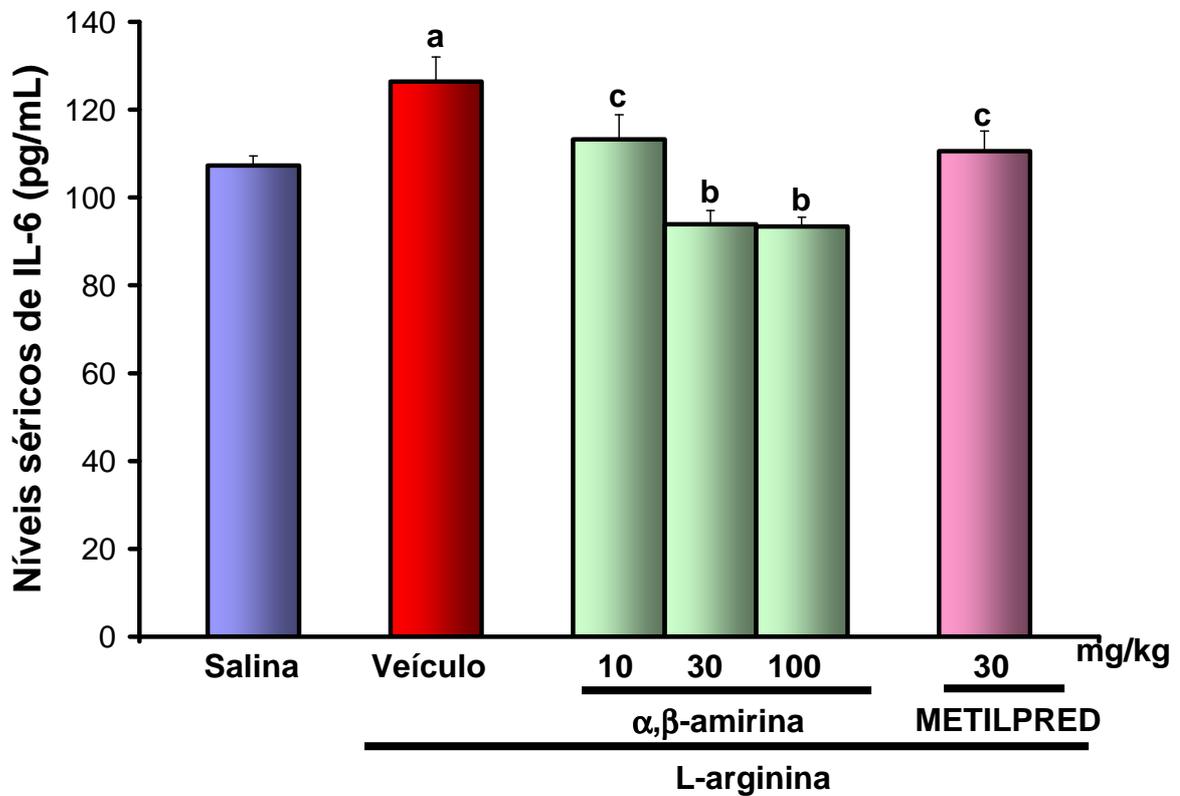


Figura 17. Efeito de α,β -amirina e METILPRED sobre os níveis séricos de IL-6 em resposta a administração de L-arg em ratos. Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração i.p. de L-arg (2 X 2,5 g/kg; 1 h de intervalo). METILPRED (30 mg/kg, i.m.) foi administrada 30 min antes da primeira injeção de L-arg. Um grupo que recebeu apenas salina i.p. foi incluído no estudo. Os valores representam a média \pm E.P.M. dos níveis séricos de IL-6. Foram utilizados 6 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs salina; ^b $p < 0,001$ vs L-arg; ^c $p < 0,05$ vs L-arg (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.3.9. Avaliação histológica do pâncreas

A figura 18 e a tabela 3 demonstram o efeito da administração oral de α,β -amirina sobre as alterações morfológicas observadas no tecido pancreático (edema, infiltrado inflamatório, vacuolização acinar, necrose e hemorragia) em resposta a administração de L-arginina em ratos. O tratamento com α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg v.o.) reduziu ($p < 0,05$) as alterações observadas. METILPRED (30 mg/kg, i.m.) reduziu significativamente ($p < 0,05$) as alterações histológicas observadas.

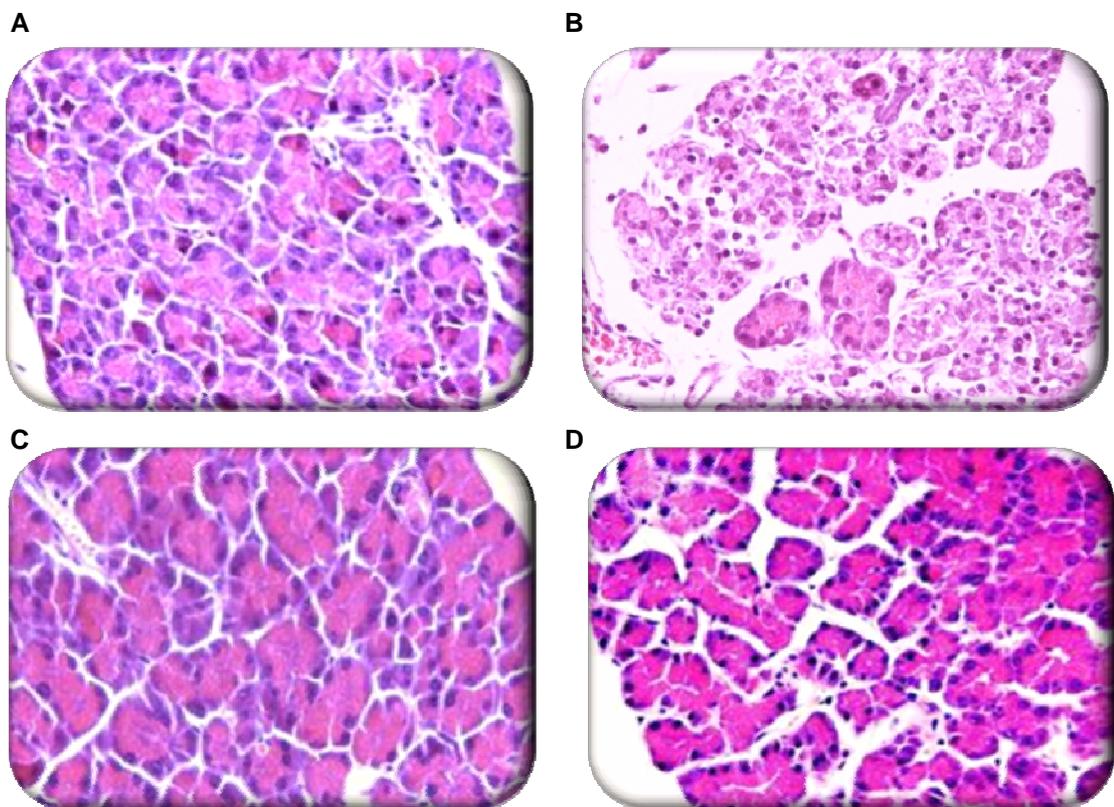


Figura 18. Fotomicrografia representativa do tecido pancreático de ratos submetidos à administração de L-arg. A: Salina; B: Veículo + L-arginina, mostrando alterações histológicas características de pancreatite aguda (edema inter e intralobular, infiltrado inflamatório, vacuolização acinar, necrose e hemorragia); C: α,β -amirina (100 mg/kg, v.o.) + L-arginina e D: METILPRED (30 mg/kg, i.m.) + L-arginina. O tratamento com α,β -amirina (100 mg/kg, v.o.) e METILPRED (30 mg/kg, i.m.) preveniram as alterações morfológicas observadas no tecido pancreático. Hematoxilina-Eosina (aumento 400X).

Tabela 3: Efeito do tratamento com α,β -amirina sobre as alterações morfológicas observadas em resposta ao tratamento com L-arg.

Grupo	Edema (0-3)	Infiltrado inflamatório (0-3)	Vacuolização acinar (0-3)	Necrose (0-3)	Hemorragia (0-3)
Salina	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
L-arginina	3 (2-3) ^a	2 (2-3) ^b	3 (3-3) ^b	3 (3-3) ^b	2 (2-3) ^a
α,β -amirina 10mg/kg	0 (0-0) ^c	0 (0-0) ^d	0 (0-1) ^c	0 (0-0) ^d	0 (0-0) ^c
α,β -amirina 30mg/kg	0 (0-0) ^c	0 (0-0) ^d	0 (0-0) ^d	0 (0-0) ^d	0 (0-0) ^c
α,β -amirina 100mg/kg	0 (0-0) ^c	0 (0-0) ^d	0 (0-1) ^c	0 (0-0) ^d	0 (0-0) ^c
Metilprednisolona 30mg/kg	0 (0-1) ^c	0 (0-0) ^d	1 (0-1) ^c	0 (0-0) ^d	0 (0-1) ^c

Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração i.p. de L-arg (2 X 2,5 g/kg; 1 h de intervalo). METILPRED (30 mg/kg, i.m.) foi administrada 30 min antes da primeira injeção de L-arginina. Um grupo que recebeu apenas salina i.p. foi incluído no estudo. Os valores representam a mediana dos escores, mostrando o intervalo mínimo e máximo dos escores atribuído. Foram utilizados (4-6) animais por grupo. ^ap<0,05 vs salina; ^bp<0,01 vs salina; ^cp<0,05 vs L-arg e ^dp<0,01 vs L-arg (Teste de Kruskal Wallis e Teste de Dunns).

6.3.10. Estudo imunohistoquímico para a determinação de iNOS

A figura 19 e a tabela 4 demonstram o efeito da administração oral de α,β -amirina sobre a intensidade da reação observadas nas lâminas de imunohistoquímica para determinação de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) observadas no tecido pancreático e nas células acinares, em resposta a administração de L-arg em ratos. O tratamento com a mistura de α,β -amirina nas doses de 30 e 100 mg/kg v.o. reduziram de maneira significativa ($p<0,05$) a intensidade de reação observada. METILPRED (30 mg/kg, i.m.) reduziu significativamente ($p<0,05$) a intensidade de reação observada.

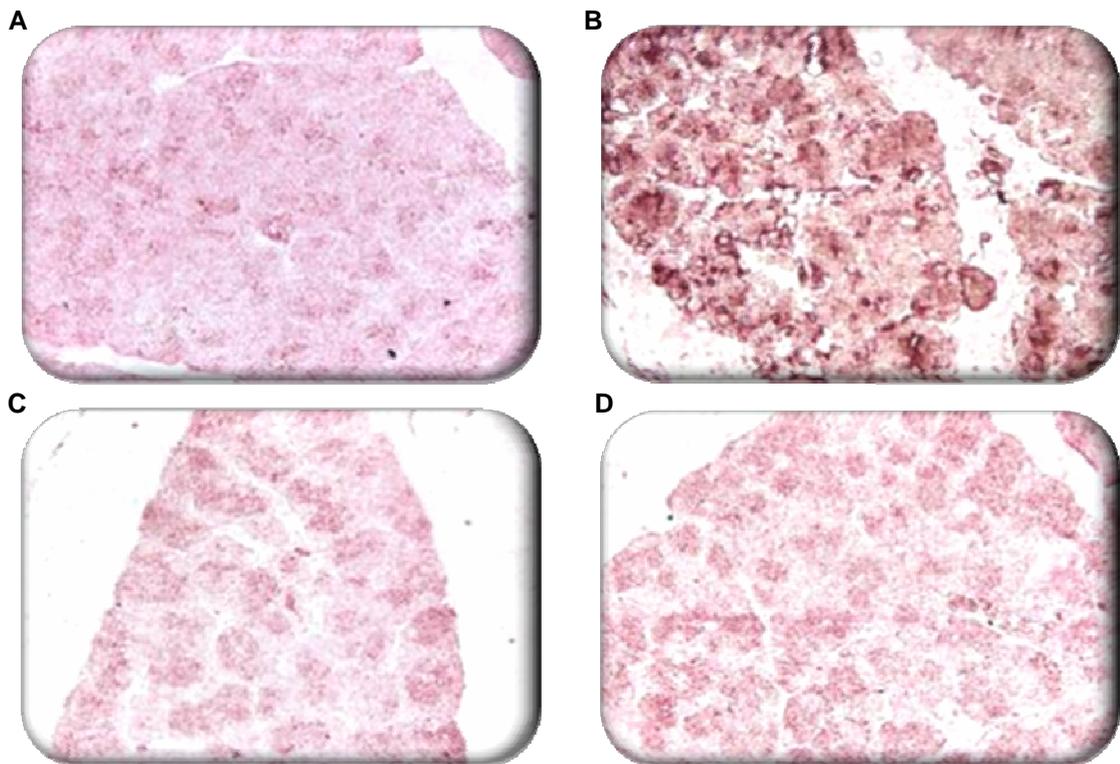


Figura 19. Imunorreatividade para a determinação de iNOS no tecido pancreático de ratos submetidos à administração de L-arg. A: Salina; B: Veículo + L-arginina; C: α,β -amirina (100 mg/kg, v.o.) + L-arginina e D: METILPRED (30 mg/kg, i.m.) + L-arginina. O tratamento com α,β -amirina (100 mg/kg, v.o.) e METILPRED (30 mg/kg, i.m.), diminuíram a imunomarcção observada no tecido pancreático (aumento 400 X).

Tabela 4: Efeito do tratamento com α,β -amirina sobre a intensidade de reação observada nas lâminas de imunohistoquímica para a determinação de iNOS em resposta ao tratamento com L-arg.

Grupo	iNOS (0-4)
Salina	1 (0-1)
L-arginina	4 (3-4) ^a
α,β -amirina 10mg/kg	2 (2-3)
α,β -amirina 30mg/kg	1 (1-2) ^b
α,β -amirina 100mg/kg	1 (1-2) ^b
Metilprednisolona 30mg/kg	1,5 (1-2) ^b

Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração i.p. de L-arg (2 X 2,5 g/kg; 1 h de intervalo). METILPRED (30 mg/kg, i.m.) foi administrada 30 min antes da primeira injeção de L-arg. Um grupo que recebeu apenas salina i.p. foi incluído no estudo. Os valores representam a mediana dos escores, mostrando o intervalo mínimo e máximo dos escores atribuídos. Foram utilizados (4-6) animais por grupo. ^ap<0,01 vs salina; ^bp<0,05 vs L-arg (Teste de Kruskal Wallis e Teste de Dunns).

6.3.11. Estudo imunohistoquímico para a determinação de TNF- α

A figura 20 e a tabela 5 demonstram o efeito da administração oral de α,β -amirina sobre a intensidade da reação observadas nas lâminas de imunohistoquímicas para determinação de TNF- α observadas no tecido pancreático e nas células acinares, em resposta a administração de L-arg em ratos. O tratamento com a mistura de α,β -amirina nas doses de 10 e 100 mg/kg v.o. reduziu de maneira significativa ($p < 0,05$) a intensidade de reação observada. METILPRED (30 mg/kg, i.m.) reduziu significativamente ($p < 0,05$) a intensidade de reação observada.

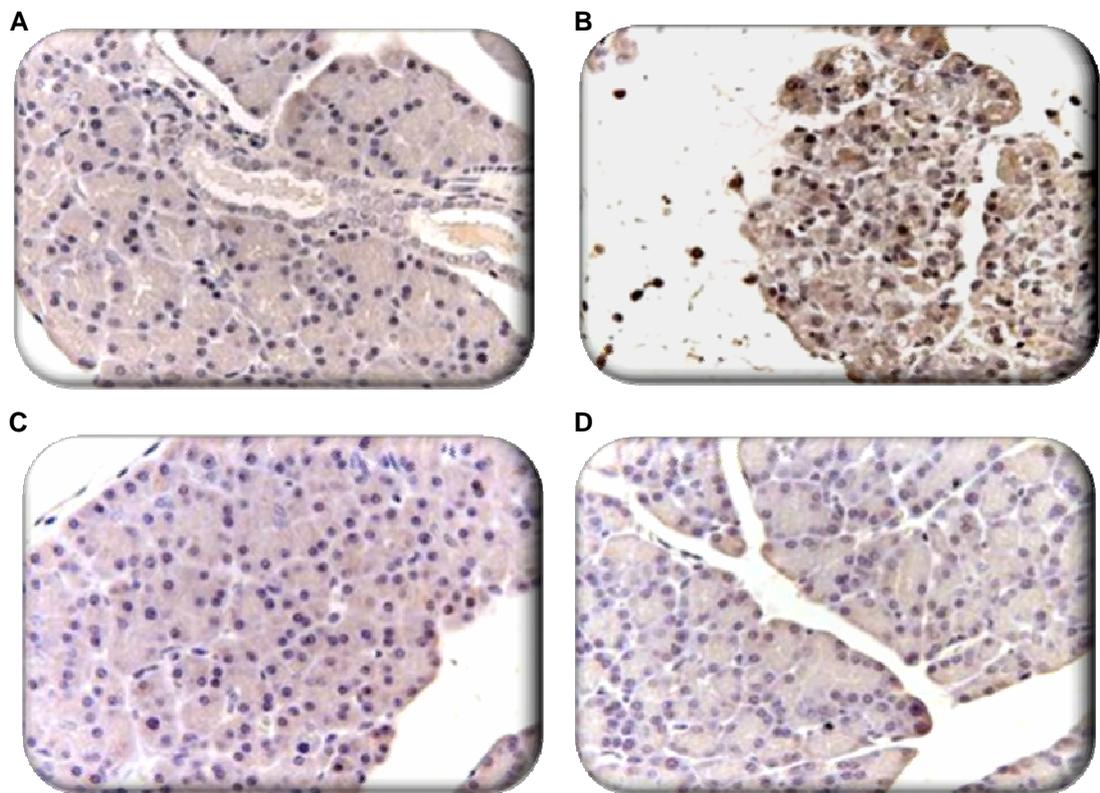


Figura 20. Imunorreatividade para a determinação de TNF- α no tecido pancreático de ratos submetidos à administração de L-arg. A: Salina; B: Veículo + L-arginina; C: α,β -amirina (100 mg/kg, v.o.) e D: METILPRED (30 mg/kg, i.m.). O tratamento com α,β -amirina (100 mg/kg, v.o.) e METILPRED (30 mg/kg, i.m.), diminuíram de maneira significativa as marcações imunohistoquímicas observadas no tecido pancreático (aumento 400 X).

Tabela 5: Efeito do tratamento com α,β -amirina sobre a intensidade de reação observada nas lâminas de imunohistoquímica para a determinação de TNF- α em resposta ao tratamento com L-arg.

Grupo	TNF-α (0-4)
Salina	0 (0-0)
L-arginina	3 (3-3) ^a
α,β -amirina 10mg/kg	0,5 (0-1) ^b
α,β -amirina 30mg/kg	1 (0-3)
α,β -amirina 100mg/kg	0,5 (0-1) ^b
Metilprednisolona 30mg/kg	0 (0-1) ^b

Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração i.p. de L-arg (2 X 2,5 g/kg; 1 h de intervalo). METILPRED (30 mg/kg, i.m.) foi administrada 30 min antes da primeira injeção de L-arg. Um grupo que recebeu apenas salina i.p. foi incluído no estudo. Os valores representam a mediana dos escores, mostrando o intervalo mínimo e máximo dos escores atribuídos. Foram utilizados (4-6) animais por grupo. ^ap<0,05 vs salina; ^bp<0,05 vs L-arg (Teste de Kruskal Wallis e Teste de Dunns).

6.3.12. Estudo imunohistoquímico para a determinação de nitrotirosina

A figura 21 e a tabela 6 demonstram o efeito da administração oral de α,β -amirina sobre a intensidade da reação observadas nas lâminas de imunohistoquímicas para determinação de nitrotirosina observadas no tecido pancreático e nas células acinares, em resposta a administração de L-arginina em ratos. O tratamento com a mistura de α,β -amirina nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg v.o. reduziu de maneira significativa ($p<0,05$) a intensidade de reação observada. METILPRED (30 mg/kg, i.m.) reduziu significativamente ($p<0,05$) a intensidade de reação observada.

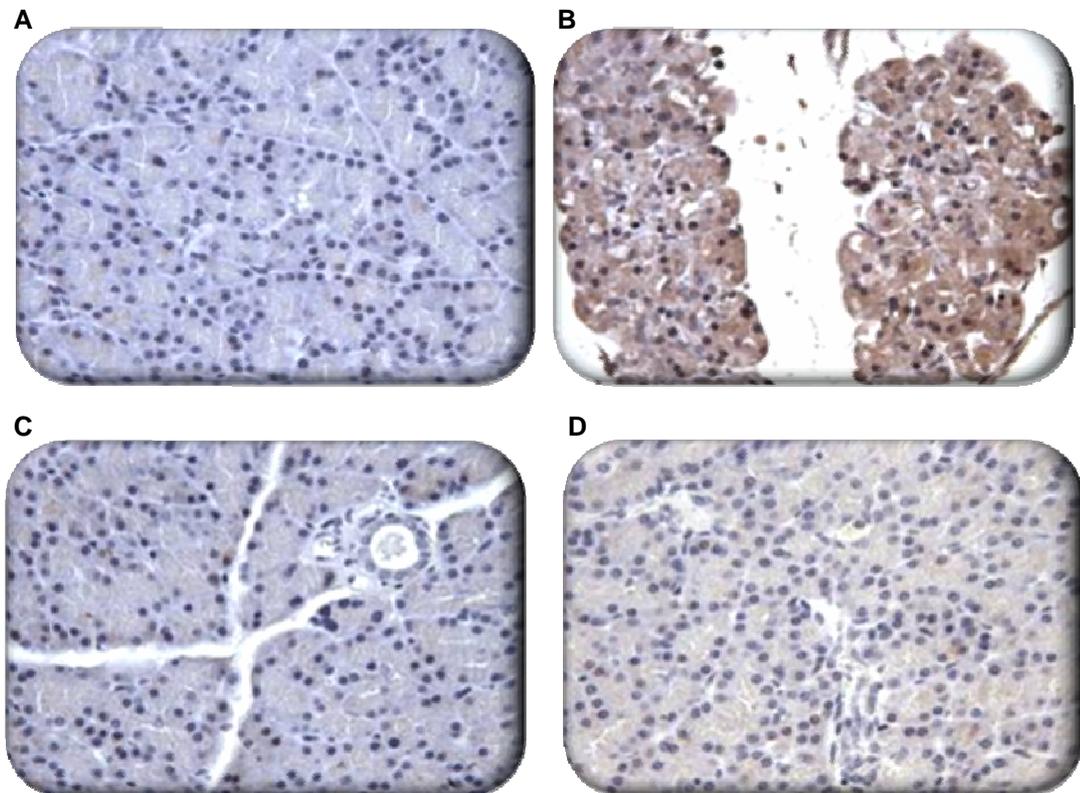


Figura 21. Imunorreatividade para a determinação de nitrotirosina no tecido pancreático de ratos submetidos à administração de L-arg. A: Salina; B: Veículo + L-arginina; C: α,β -amirina (100 mg/kg, v.o.) e D: METILPRED (30 mg/kg, i.m.). O tratamento com α,β -amirina (100 mg/kg, v.o.) e METILPRED (30 mg/kg, i.m.), diminuiram significativamente as marcações imunohistoquímicas observadas no tecido pancreático (aumento 400 X).

Tabela 6: Efeito do tratamento com α,β -amirina sobre a intensidade de reação observada nas lâminas de imunohistoquímica para a determinação de nitrotirosina em resposta ao tratamento com L-arg.

Grupo	Nitrotirosina (0-4)
Salina	0 (0-0)
L-arginina	4 (3-4) ^a
α,β -amirina 10mg/kg	0 (0-1) ^b
α,β -amirina 30mg/kg	0 (0-1) ^b
α,β -amirina 100mg/kg	0 (0-1) ^b
Metilprednisolona 30mg/kg	0 (0-2) ^b

Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração i.p. de L-arg. (2 X 2,5 g/kg; 1 h de intervalo). METILPRED (30 mg/kg, i.m.) foi administrada 30 min antes da primeira injeção de L-arginina. Um grupo que recebeu apenas salina i.p. foi incluído no estudo. Os valores representam a mediana dos escores, mostrando o intervalo mínimo e máximo dos escores atribuído. Foram utilizados (4-6) animais por grupo. ^a $p < 0,01$ vs salina; ^b $p < 0,05$ vs L-arg (ANOVA seguida pelo teste de Kruskal Wallis).

6.4. Caracterização da atividade da mistura de α,β -amirina na pancreatite aguda induzida pela administração de ceruleína em camundongos

6.4.1. Determinação de amilase sérica

α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg v.o.) reduziu ($p < 0,001$) a amilase sérica de $1835 \pm 129,7$ U/dL (ceruleína) para $826,6 \pm 36,3$; $591,4 \pm 75,4$ e $336,5 \pm 24,8$ U/dL (redução de 55; 68 e 82%) respectivamente. TAL (200 mg/kg, v.o.) antiinflamatório, controle positivo utilizado, reduziu ($p < 0,001$) os níveis séricos da amilase para $1298 \pm 140,8$ U/dL, mostrando uma redução de 29% (Figura 22).

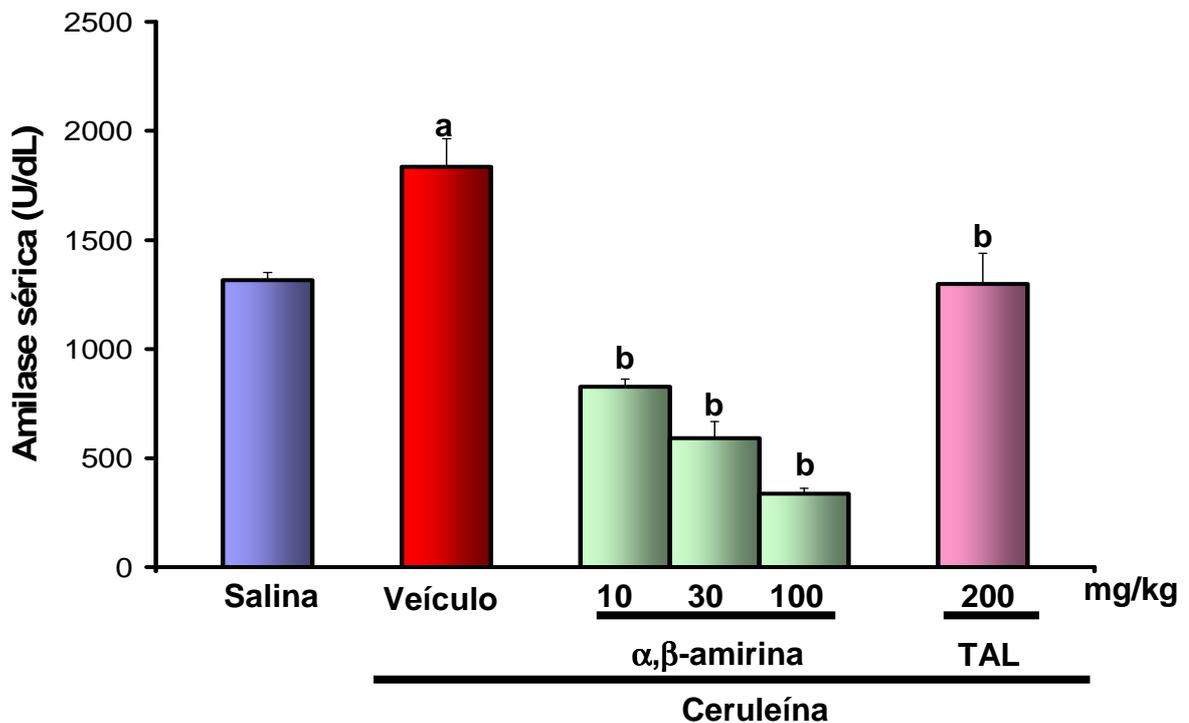


Figura 22. Efeito de α,β -amirina e TAL sobre os níveis de amilase sérica em resposta a administração de ceruleína (CER) em camundongos. Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração i.p. de CER (5 X 50 μ g/kg; 1h de intervalo). TAL (200 mg/kg, v.o.) foi administrada 60 min antes de CER. Um grupo que recebeu apenas salina i.p. foi incluído. Os valores representam a média \pm E.P.M. dos níveis de amilase (U/dL). Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,001$ vs salina; ^b $p < 0,001$ vs CER (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.4.2. Determinação de lipase sérica

A mistura de α,β -amirina apenas na dose de 100 mg/kg v.o. reduziu de maneira significativa ($p<0,001$) o aumento da lipase sérica de $237,7 \pm 8,9$ U/L para $123,6 \pm 19,7$ U/L (redução de 48%). TAL (200 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente ($p<0,01$) os níveis séricos da lipase de $237,7 \pm 19,7$ U/L (CER) para $179,7 \pm 16,6$ U/L, mostrando uma redução de 24,4% da lipase sérica (Figura 23).

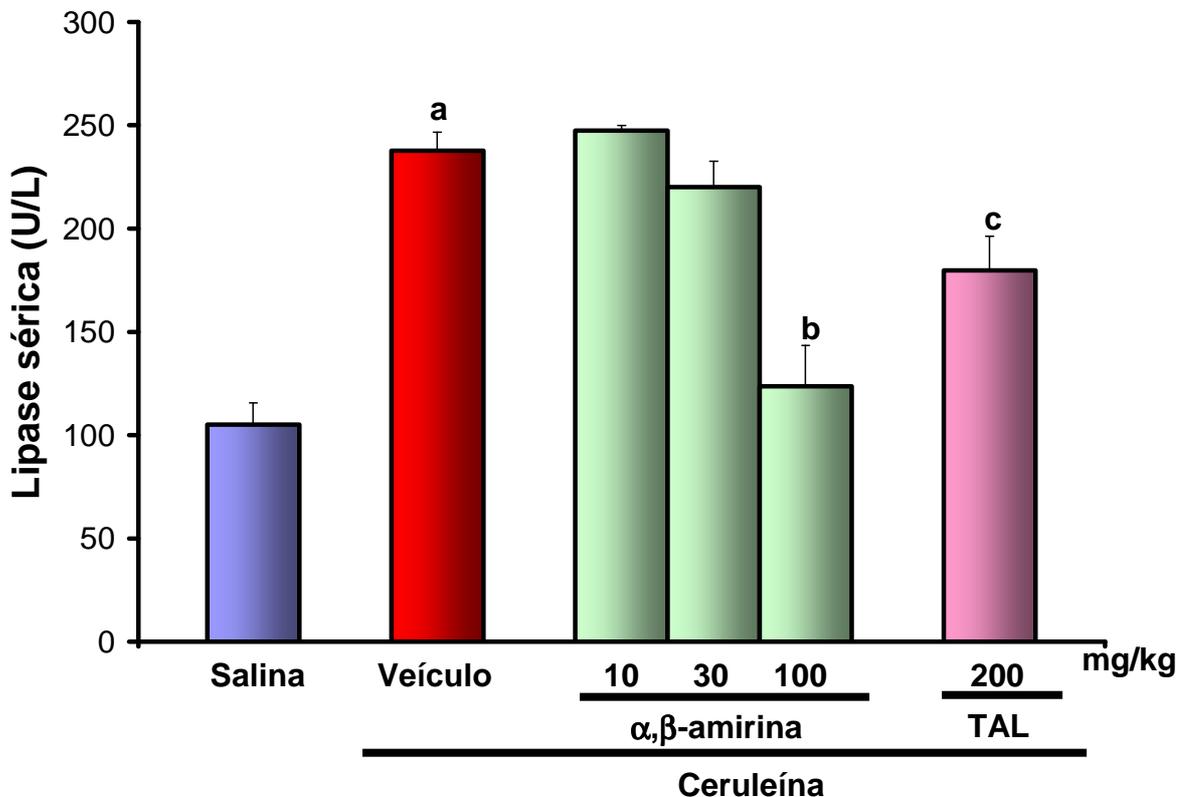


Figura 23. Efeito de α,β -amirina e TAL sobre os níveis de lipase sérica em resposta a administração de CER em camundongos. Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração intraperitoneal de CER (5 X 50 μ g/kg; 1 h de intervalo). TAL (200 mg/kg, v.o.) foi administrada 60 min antes da primeira injeção i.p. de CER. Um grupo que recebeu apenas salina i.p. foi incluído no estudo. Os valores representam a média \pm E.P.M. dos níveis séricos de lipase (U/L). Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p<0,001$ vs salina; ^b $p<0,001$ vs CER; ^c $p<0,01$ vs CER (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.4.3. Determinação do grau de edema pancreático

A mistura de α,β -amirina apenas nas doses 30 e 100 mg/kg, v.o., reduziu significativamente ($p < 0,05$) o edema de $5,9 \pm 0,2$ mg/g para $5,1 \pm 0,2$ e $4,8 \pm 0,2$ mg/g (redução de 14 e 19%) respectivamente. TAL (200 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente ($p < 0,001$) o grau de edema pancreático de $5,9 \pm 0,2$ mg/g (CER) para $4,3 \pm 0,1$ mg/g, mostrando uma redução de 28% do edema (Figura 24).

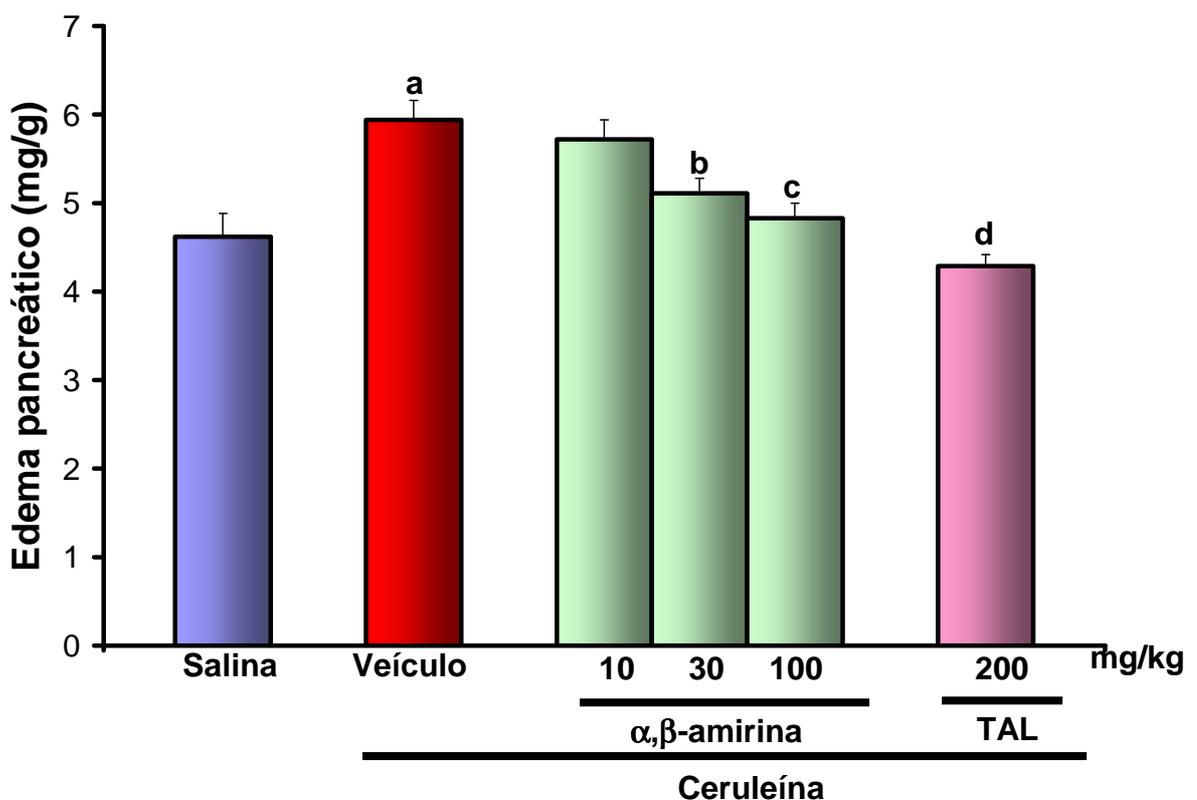


Figura 24. Efeito de α,β -amirina e TAL sobre o grau de edema pancreático em resposta a administração de CER em camundongos. Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração i.p. de CER (5 X 50 μ g/kg; 1 h de intervalo). TAL (200 mg/kg, v.o.) foi administrada 60 min antes da primeira injeção de ceruleína. Um grupo que recebeu apenas salina i.p. foi incluído no estudo. Os valores representam a média \pm E.P.M. da relação entre o peso do pâncreas e o peso do animal. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,001$ vs salina; ^b $p < 0,05$ vs L-arg; ^c $p < 0,01$ vs CER; ^d $p < 0,001$ vs CER (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.4.4. Determinação da atividade da mieloperoxidase

A mistura de α,β -amirina nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg v.o. reduziu de maneira significativa ($p < 0,05$) o aumento da atividade de MPO induzida pela administração de CER de $0,1 \pm 0,02$ (Abs. 470 nm) para $0,05 \pm 0,007$; $0,05 \pm 0,01$ e $0,05 \pm 0,06$ (Abs. 470 nm) (redução de 49; 54 e 47%) respectivamente. TAL (200 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente ($p < 0,05$) o aumento da atividade de MPO de $0,1 \pm 0,02$ (Abs. 470 nm) (CER) para $0,07 \pm 0,004$ (Abs. 470 nm), mostrando uma redução de 27% do aumento da atividade de MPO (Figura 25).

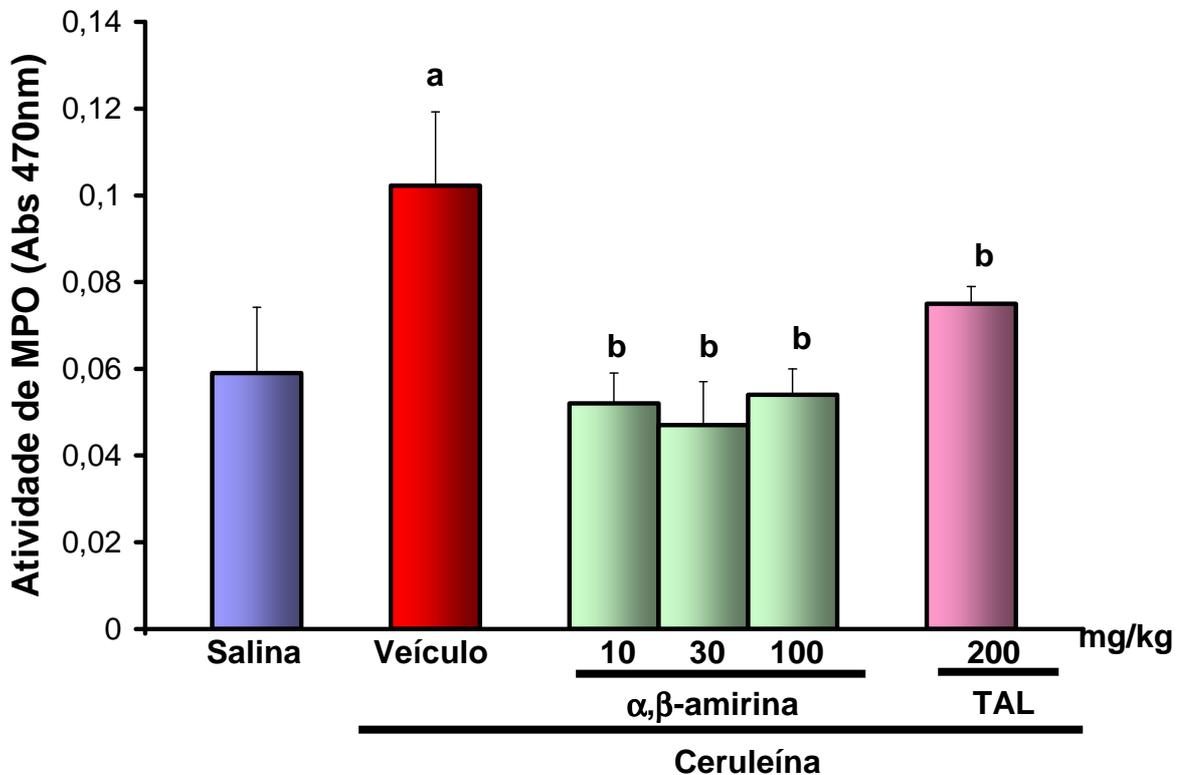


Figura 25. Efeito de α,β -amirina e TAL sobre o aumento da atividade de MPO em resposta a administração de CER em camundongos. Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração i.p. de CER (5 X 50 μ g/kg; 1 h de intervalo). TAL (200 mg/kg, v.o.) foi administrada 60 min antes da primeira injeção de ceruleína. Um grupo que recebeu apenas salina i.p. foi incluído no estudo. Os valores representam a média \pm E.P.M. da atividade de MPO (Abs. 470 nm). Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ vs salina; ^b $p < 0,05$ vs L-arg (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.4.5. Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg v.o.) reduziu ($p<0,05$) o aumento da quantidade de TBARS de $27,8 \pm 1,4 \mu\text{M}$ para $23,3 \pm 0,9$; $21,8 \pm 1,9$ e $21,7 \pm 1,2 \mu\text{M}$ (redução de 16; 22 e 22%) respectivamente. TAL (200 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente ($p<0,05$) o aumento da quantidade de TBARS para $22,3 \pm 0,9 \mu\text{M}$, mostrando uma redução de 20% do aumento de TBARS (Figura 26).

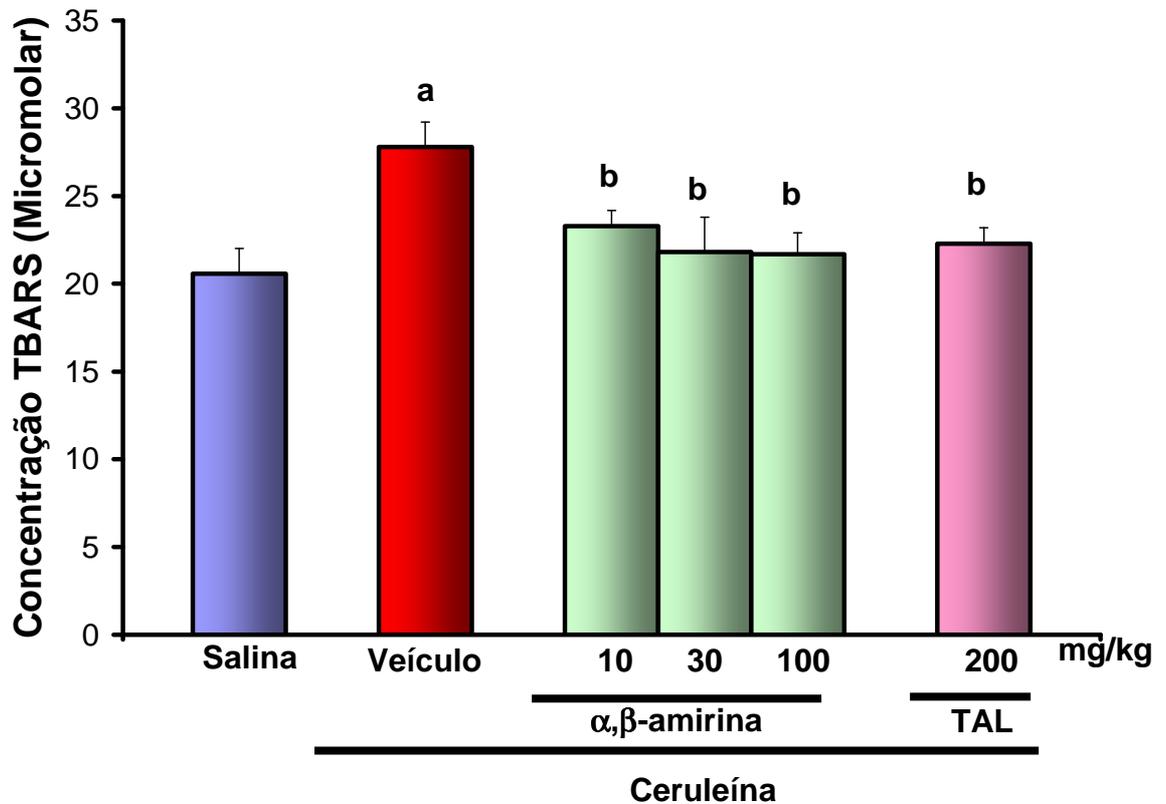


Figura 26. Efeito de α,β -amirina e TAL sobre o aumento de TBARS em resposta a administração de CER em camundongos. Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração i.p. de CER (5 X 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 1 h de intervalo). TAL (200 mg/kg, v.o.) foi administrada 60 min antes da primeira injeção de ceruleína. Um grupo que recebeu apenas salina i.p. foi incluído no estudo. Os valores representam a média \pm E.P.M. da quantidade de TBARS (μM). Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p<0,05$ vs salina; ^b $p<0,05$ vs CER (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.4.6. Determinação sérica de TNF- α

A mistura de α,β -amirina nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg v.o. reduziu significativamente ($p < 0,05$) os níveis de TNF- α de $123,0 \pm 8,6$ pg/mL para $42,6 \pm 9,0$; $35,2 \pm 10,2$ e $9,16 \pm 6,3$ pg/mL (redução de 65; 71 e 92%) respectivamente. TAL (200 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente ($p < 0,05$) os níveis de TNF- α sérico de $123,0 \pm 8,6$ pg/mL (CER) para $33,2 \pm 4,5$ pg/mL mostrando uma redução de 73% dos níveis de TNF- α (Figura 27) .

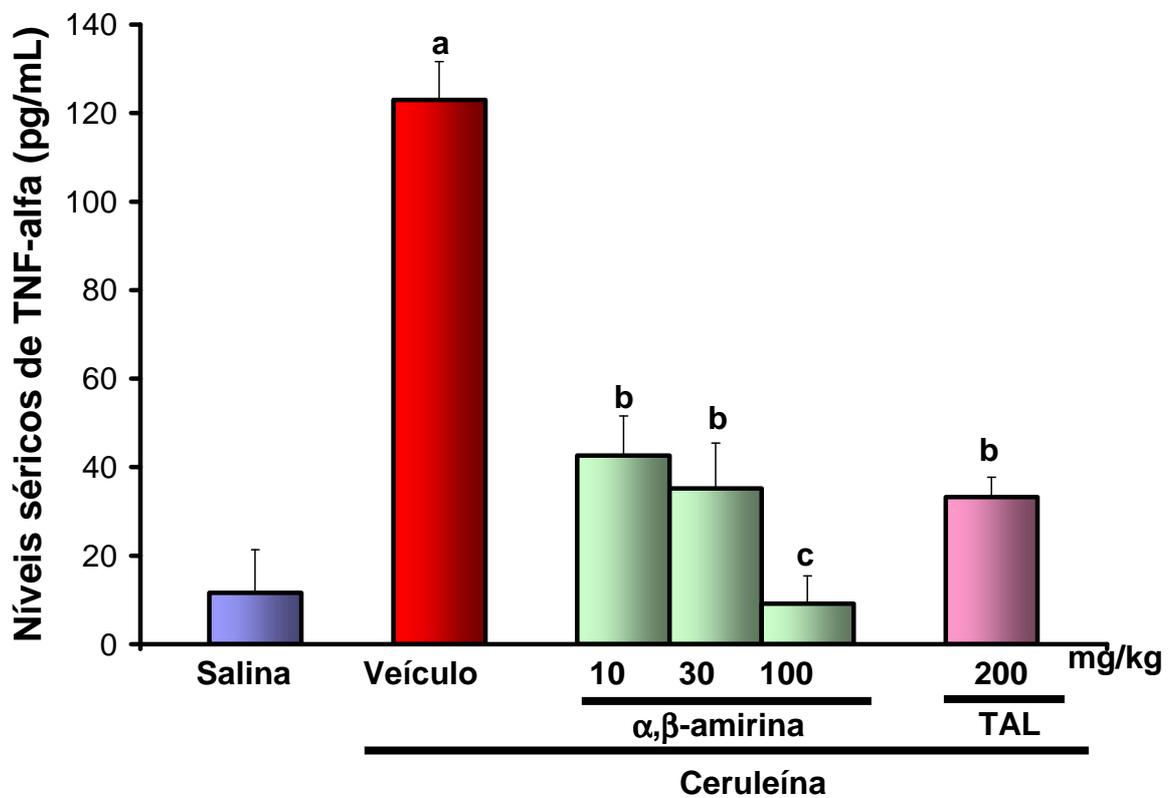


Figura 27. Efeito de α,β -amirina e TAL sobre os níveis séricos de TNF- α em resposta a administração de CER em camundongos. Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração i.p. de CER (5 X 50 μ g/kg; 1 h de intervalo). TAL (200 mg/kg, v.o.) foi administrada 60 min antes da primeira injeção de CER. Um grupo que recebeu apenas salina i.p. foi incluído no estudo. Os valores representam a média \pm E.P.M. dos níveis séricos de TNF- α . Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p < 0,01$ vs salina; ^b $p < 0,05$ vs veículo; ^c $p < 0,01$ vs veículo (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.4.7. Determinação sérica de IL-6

A mistura de α,β -amirina nas doses 10, 30 e 100 mg/kg v.o. reduziu significativamente ($p<0,05$) os níveis de IL-6 de $50,8 \pm 19,7$ pg/mL para $12,8 \pm 1,8$; $11,3 \pm 2,7$ e $8,8 \pm 2,9$ pg/mL (redução de 75; 78 e 83%) respectivamente. TAL (200 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente ($p<0,05$) os níveis de IL-6 sérico de $50,8 \pm 19,7$ pg/mL (CER) para $25,1 \pm 3,9$ pg/mL, mostrando um percentual de inibição de 50,5% dos níveis de IL-6 (Figura 28).

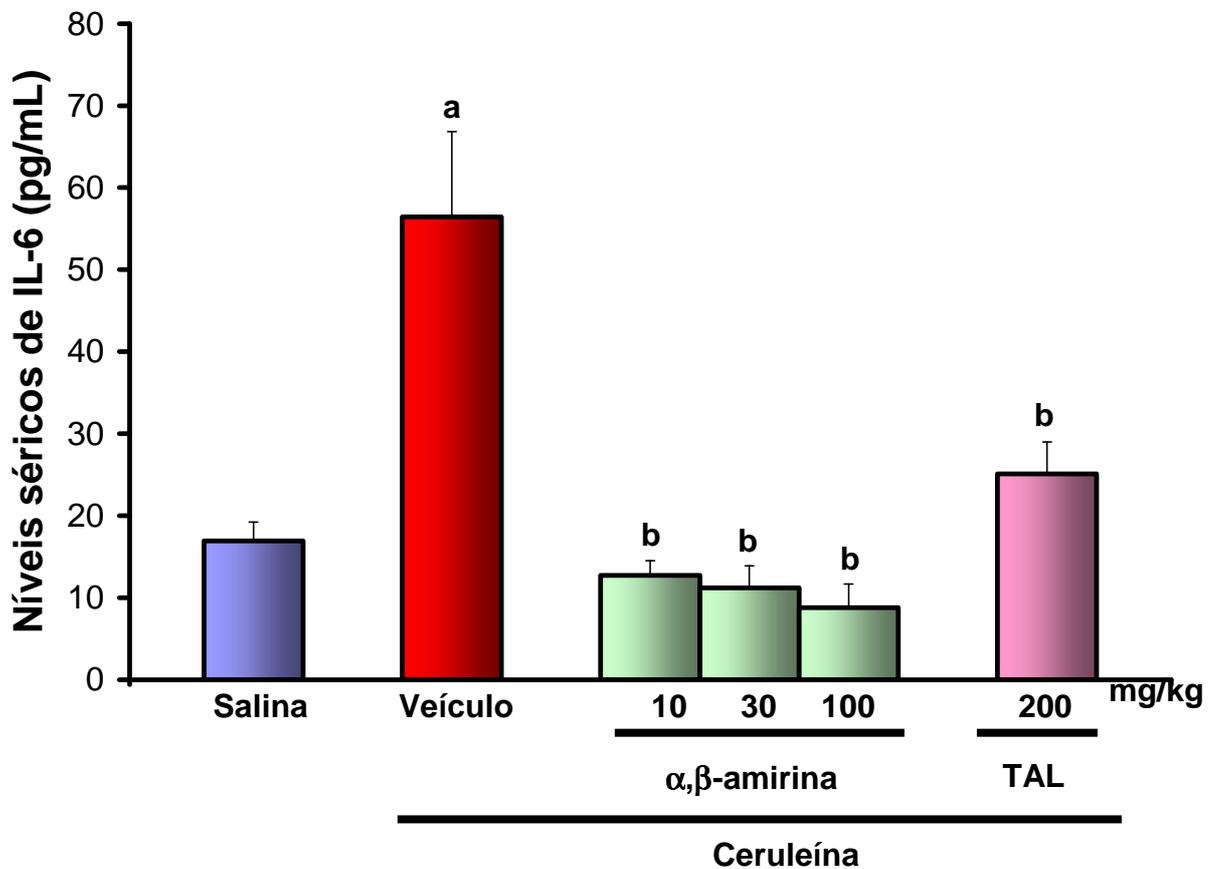


Figura 28. Efeito de α,β -amirina e TAL sobre os níveis séricos de IL-6 em resposta a administração de CER em camundongos. Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração i.p. de CER (5 X 50 μ g/kg; 1 h de intervalo). TAL (200 mg/kg, v.o.) foi administrada 60 min antes da CER. Um grupo que recebeu apenas salina i.p. foi incluído no estudo. Os valores representam a média \pm E.P.M. dos níveis séricos de IL-6. Foram utilizados 8 animais por grupo. ^a $p<0,05$ vs salina; ^b $p<0,05$ vs CER (ANOVA e teste de Student Newman Keul).

6.4.8. Avaliação histológica do pâncreas

A figura 29 e tabela 7 demonstram o efeito da administração oral de α,β -amirina sobre as alterações morfológicas observadas no tecido pancreático (edema, infiltrado inflamatório, vacuolização acinar e necrose) em resposta a administração de CER em camundongos. O tratamento com a mistura de α,β -amirina na dose de 100 mg/kg v.o. reduziu as alterações observadas. TAL (200 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente ($p < 0,05$) as alterações histológicas observadas.

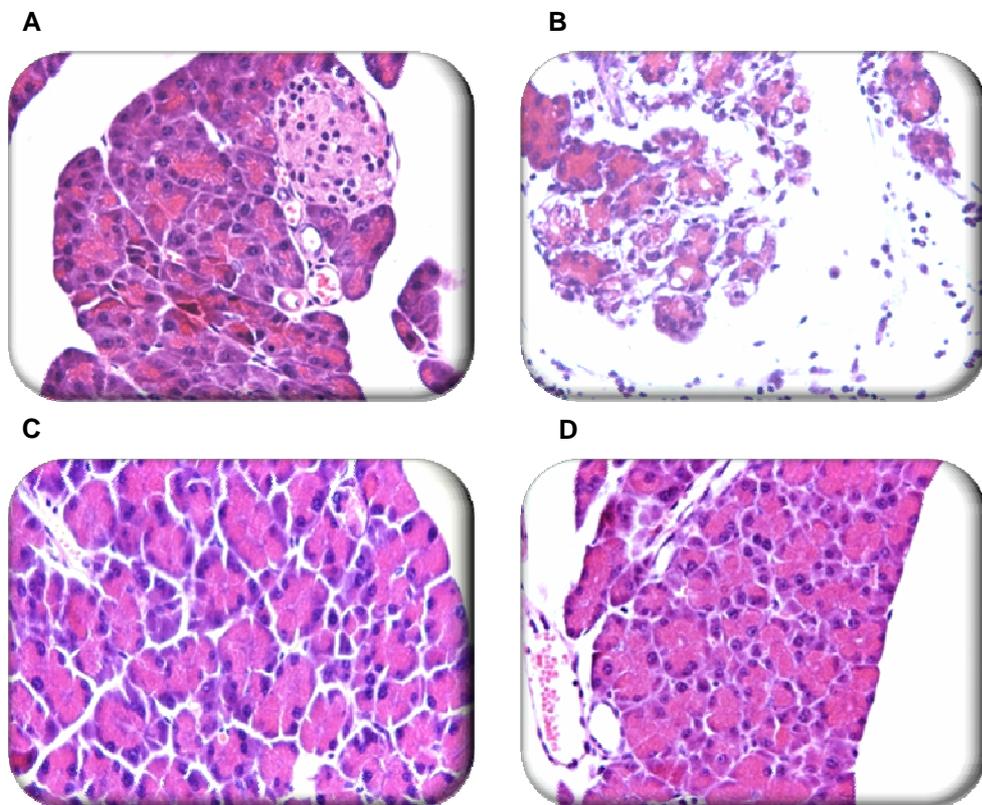


Figura 29. Fotomicrografia representativa do tecido pancreático de camundongos submetidos à administração de altas doses de CER. A: salina, mostrando uma arquitetura normal; B: veículo + ceruleína, mostrando desorganização da arquitetura pancreática, com vacuolização das células acinares, grande área de necrose das células acinares e infiltrado de células inflamatórias; C: α,β -amirina (100 mg/kg) e D: TAL (200 mg/kg), mostrando proteção dos danos histológicos do pâncreas induzidos por CER. Hematoxilina-Eosina (aumento 400 X).

Tabela 7: Efeitos do tratamento de α,β -amirina sobre as alterações morfológicas observadas em resposta a administração de CER em camundongos

Grupo	Edema (0-3)	Infiltrado inflamatório (0-3)	Vacuolização acinar (0-3)	Necrose (0-3)
Salina	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Ceruleína	2 (1-3) ^a	2 (1-3) ^a	2 (0-3) ^a	1,5 (0-3) ^a
α,β -amirina 10mg/kg	1 (0-2)	1 (0-3)	1 (0-2)	0,5 (0-3)
α,β -amirina 30mg/kg	1 (0-3)	1 (0-2)	1 (0-2)	0 (0-1)
α,β -amirina 100mg/kg	0 (0-0) ^b	0 (0-1) ^b	0 (0-1) ^b	0 (0-0) ^b
Talidomida 200 mg/kg	0 (0-1) ^b	0 (0-1) ^b	0 (0-1) ^b	0 (0-1) ^b

Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração i.p. de CER (5 X 50 μ g/kg; 1 h de intervalo). TAL (200 mg/kg, v.o.) foi administrada 60 min antes da primeira injeção de CER. Um grupo que recebeu apenas salina i.p. foi incluído no estudo. Os valores representam a mediana dos escores, mostrando os valores mínimo e máximo dos escores atribuído. Foram utilizados (6-8) animais por grupo. ^ap<0,05 vs salina; ^bp<0,05 vs ceruleína (Teste de Kruskal Wallis e Teste de Dunns).

6.4.9. Estudo imunohistoquímico para a determinação de TNF- α

A figura 30 e a tabela 8 mostram o efeito da administração oral de α,β -amirina sobre a reação observada nas lâminas de imunohistoquímicas para determinação de TNF- α no tecido pancreático, nas células acinares e células inflamatórias em resposta a administração de CER em camundongos. O tratamento com a mistura de α,β -amirina nas doses de 30 e 100 mg/kg v.o. mostrou menor imunoreatividade quando comparada ao grupo CER. TAL (200 mg/kg, v.o.) também mostrou baixa intensidade de reação quando comparado ao grupo CER.

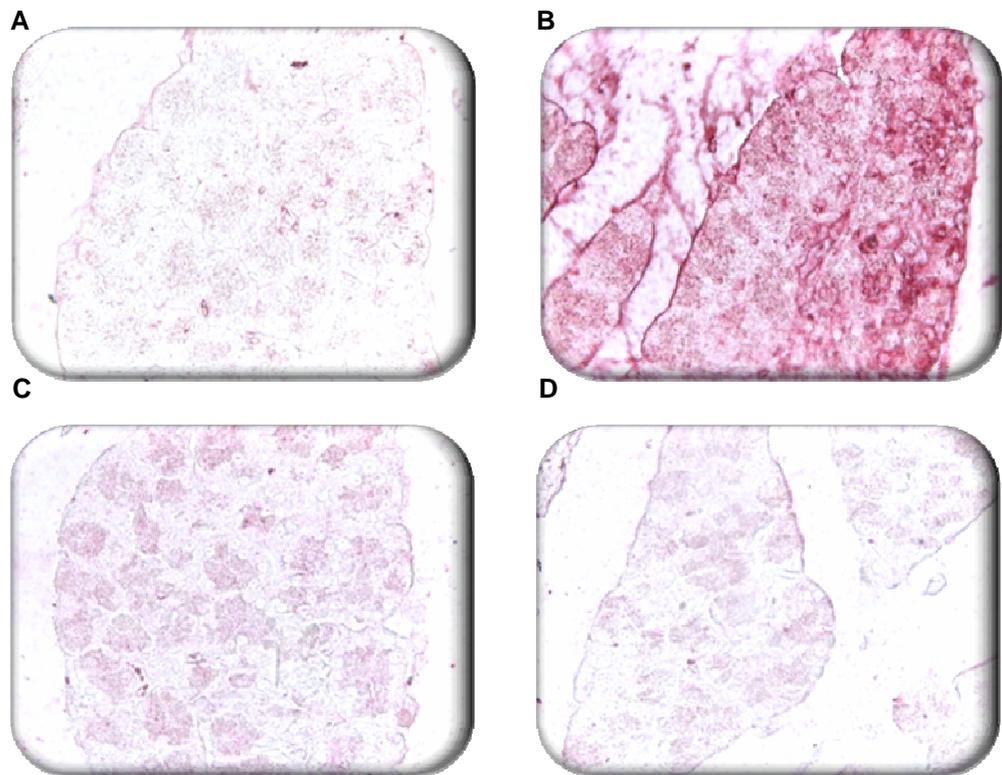


Figura 30. Imunoreatividade para a determinação de TNF- α no tecido pancreático de camundongos submetidos à administração de altas doses de CER. A: Salina; B: Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) + Ceruleína; C: α,β -amirina (100 mg/kg, v.o.) e D: Talidomida (200 mg/kg, v.o.) (aumento 400 X).

Tabela 8: Efeito do tratamento com α,β -amirina sobre a intensidade de reação observada nas lâminas de imunohistoquímica para a determinação de TNF- α em resposta ao tratamento com CER.

Grupo	TNF-α (0-4)
Salina	0 (0-0)
Ceruleína	3,5 (3-4) ^a
α,β -amirina 10mg/kg	1,0 (1-1)
α,β -amirina 30mg/kg	0,5 (0-1) ^b
α,β -amirina 100mg/kg	0,5 (0-1) ^b
Talidomida 200mg/kg	0,5 (0-1) ^b

Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração i.p. de CER (5 X 50 μ g/kg; 1 h de intervalo). TAL (200 mg/kg, v.o.) foi administrada 60 min antes da primeira injeção de CER. Um grupo que recebeu apenas salina i.p. foi incluído no estudo. Os valores representam a mediana dos escores, mostrando o intervalo mínimo e máximo dos escores atribuído. Foram utilizados (6-8) animais por grupo. ^ap<0,001 vs salina; ^bp<0,05 vs ceruleína (Teste de Kruskal Wallis e Teste de Dunns).

6.4.10. Estudo imunohistoquímico para determinação de iNOS

A figura 31 e a tabela 9 mostram o efeito da administração oral de α,β -amirina sobre a reação observada nas lâminas de imunohistoquímicas para determinação de iNOS no tecido pancreático, nas células acinares e células inflamatórias, em resposta a administração de ceruleína em camundongos. O tratamento com a mistura de α,β -amirina na dose de 100 mg/kg v.o. mostrou menor imunoreatividade quando comparada ao grupo CER. TAL (200 mg/kg, v.o.) também mostrou baixa intensidade de reação quando comparado ao grupo CER.

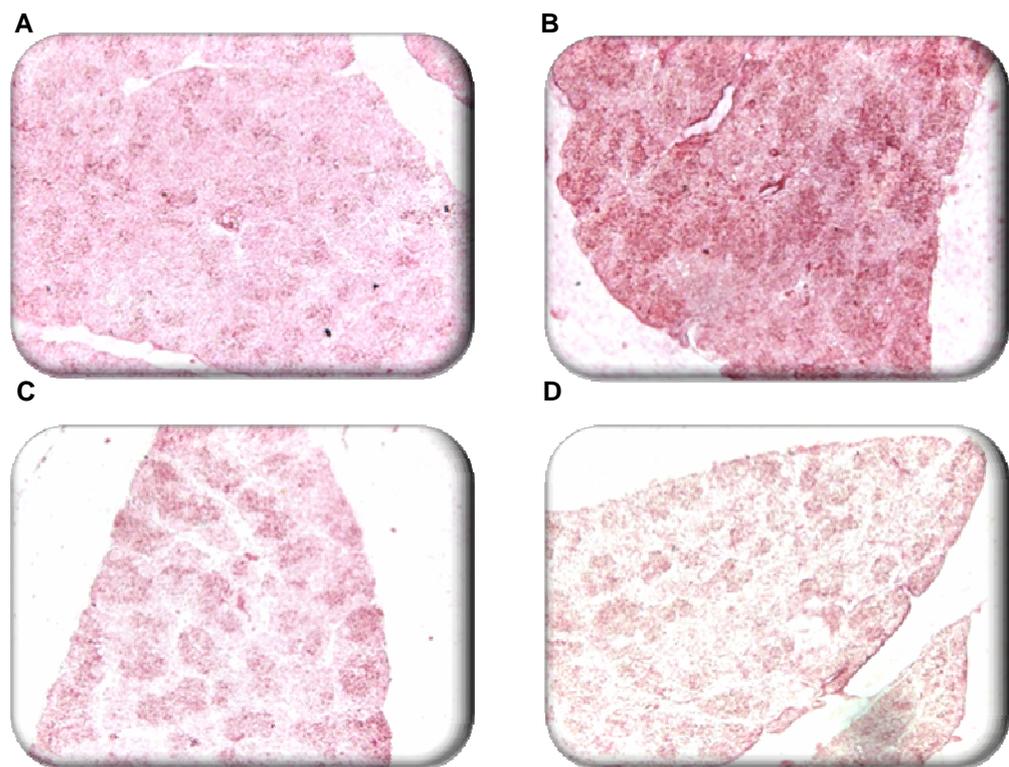


Figura 31. Imunoreatividade para a determinação de iNOS no tecido pancreático de camundongos submetidos à administração de altas doses de CER. A: Salina; B: Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) + Ceruleína; C: α,β -amirina (100 mg/kg, v.o.) e D: Talidomida (200 mg/kg, v.o.).

Tabela 9: Efeito do tratamento com α,β -amirina sobre a intensidade de reação observada nas lâminas de imunohistoquímica para a determinação de iNOS em resposta ao tratamento com CER.

Grupo	iNOS (0-4)
Salina	0,5 (0-1)
Ceruleína	4,0 (3-4) ^a
α,β -amirina 10mg/kg	1,5 (1-2)
α,β -amirina 30mg/kg	1,0 (0-2)
α,β -amirina 100mg/kg	0,5 (0-1) ^b
Talidomida 200mg/kg	0,5 (0-1) ^b

Veículo (2% de Tween 80 em água destilada, v.o., 10 mL/kg) e α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) foram administrados 48, 24 e 1,5 h antes da administração i.p. de CER (5 X 50 μ g/kg; 1 h de intervalo). TAL (200 mg/kg, v.o.) foi administrada 60 min antes da primeira injeção de CER. Um grupo que recebeu apenas salina i.p. foi incluído no estudo. Os valores representam a mediana dos escores, mostrando o intervalo mínimo e máximo dos escores atribuído. Foram utilizados (6-8) animais por grupo. ^ap<0,05 vs salina; ^bp<0,05 vs ceruleína (Teste de Kruskal Wallis e Teste de Dunns).

7. DISCUSSÃO

A utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e vem crescendo junto à comunidade médica. No entanto, devem ser utilizadas plantas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, apresentando comprovada eficácia e segurança (CECHINEL & YUNES, 1998; KINGORN, 2001).

A importância das plantas medicinais deve-se também por sua contribuição como fonte natural de fármacos e por proporcionar grandes chances de obter-se uma molécula protótipo devido à diversidade de constituintes presentes nestas (KINGORN, 2001; MORETTO, 2000). A partir dos produtos naturais, incluindo as toxinas extraídas de animais, de bactérias, de fungos ou de plantas, foi possível compreender os diversos fenômenos relacionados à biologia celular e molecular e a eletrofisiologia, permitindo que estruturas biológicas fossem identificadas, isoladas e clonadas. O que tornou possível à indústria farmacêutica modelar drogas providas de maior seletividade e também mais eficazes contra várias patologias (CALIXTO, 2005).

Aproximadamente 25% de todas as drogas modernas disponíveis são derivadas, direta ou indiretamente, de plantas (DE SMET, 1997). Entre os exemplos mais interessantes estão os salicilatos que levaram ao desenvolvimento das maiores classes de drogas analgésicas, principalmente, opióides e drogas antiinflamatórias não esteroidais (CALIXTO et al., 2000, 2001).

Protium heptaphyllum, uma Burseraceae, popularmente denominada por almecegueira, breu-branco verdadeiro, almecegueira cheirosa, almecegueira de cheiro, almecegueira vermelha e almecegueiro bravo (CORRÊA, 1984), é freqüentemente encontrada na Amazônia e no Nordeste do Brasil. A resina coletada do tronco dessa espécie apresenta comprovadas propriedades antiinflamatórias e analgésicas (SIANI et al., 1999).

A análise fitoquímica de *P. heptaphyllum* revelou a presença de monoterpenos e triterpenos pentacíclicos, incluindo a mistura de α,β -amirina componente majoritário encontrado na resina (SUSUNAGA et al., 2001; VIEIRA-JUNIOR, 2005), a qual, a partir de estudos prévios, foi atribuída diversas atividades farmacológicas, tais como: antinociceptiva, anti-inflamatória, antiprurítogênica, gastroprotetora e hepatoprotetora (OLIVEIRA et al., 2004 a,b, 2005a; HOLANDA-PINTO et al., 2008 a, b; LIMA-JUNIOR et al., 2006, 2007).

Estudos de toxicidade aguda, realizados tanto com a resina quanto com a mistura de α,β -amirina, revelaram baixa toxicidade, uma vez que não foi possível estabelecer a DL_{50} . A administração oral da resina ou da mistura de α,β -amirina até as doses de 5g/kg e 3g/kg, respectivamente, não foram tóxicas aos camundongos com até 72 horas de observação. Da mesma forma os animais que receberam, por via intraperitoneal, a resina ou a mistura de α,β -amirina até as doses de 1g/kg e 2g/kg, respectivamente, não mostraram sinais clínicos de toxicidade e nenhuma morte foi observada no período de até 72 horas (OLIVEIRA et al., 2004a).

Pesquisas experimentais demonstraram a eficácia de compostos derivados de plantas, *Hypericum perforatum* (GENOVESE et al., 2006), *Gardênia jasminoides* (JUNG et al., 2008), *Patrinia scabiosaefolia* (SEO et al., 2006), *Taraxacum officinale* (SEO et al., 2005) e *Gingko biloba* (ZEYBEK et al., 2003), bem como de compostos antioxidantes, tais como: melatonina, ácido ascórbico, N-acetilcisteína, ômega-3 e resveratrol (FOITZIK et al., 2002; ESREFOGLU et al., 2006; LAWINSKI et al., 2005; SZABOLCS et al., 2006b) na prevenção da pancreatite aguda experimental por mecanismos que envolvem: redução de mudanças histológicas pancreáticas, redução da atividade da mieloperoxidase, inibição da ativação de NF- κ B, redução dos níveis pancreáticos de TNF- α e IL-6, redução dos níveis séricos de amilase e lipase, redução do estresse oxidativo e redução de óxido nítrico (NO) (GENOVESE et al., 2006; JUNG et al., 2008; MAO et al., 2003; WANG et al., 2003; SEO et al., 2005, 2006; ZEYBEK et al., 2003; FOITZIK et al., 2002; ESREFOGLU et al., 2006; LAWINSKI et al., 2005; SZABOLCS et al., 2006b).

Diante do grande uso popular do *P. heptaphyllum*, da segurança, eficácia e das atividades farmacológicas atribuídas à mistura de α,β -amirina, bem como da

eficácia de compostos derivados de plantas na prevenção ou melhora da pancreatite aguda, foi investigado no presente estudo, a potencial atividade dessa mistura na prevenção do desenvolvimento de pancreatite aguda em modelos experimentais induzidos por L-arginina ou ceruleína.

Existe uma variedade de protocolos experimentais para o estudo da PA, entretanto esse trabalho procurou avaliar a atividade de α,β - amirina em modelos de PA induzida por L-arginina e ceruleína por serem modelos não invasivos, facilmente reproduzíveis e rápidos. Juntos os dois modelos fornecem subsídios para o entendimento da patogênese e das complicações associadas à PA. Sendo o modelo de L-arginina mais indicado para o estudo da patogênese da PA, tendo como vantagem de atingir apenas o pâncreas pelos seus efeitos tóxicos, enquanto que o modelo da ceruleína permite estudar complicações associadas, PA associada à injúria pulmonar, uma complicação comum que contribui de forma significativa com o aumento da taxa de mortalidade dos pacientes. O modelo induzido por ceruleína ainda apresenta a vantagem de reproduzir as características clínicas da pancreatite aguda que acomete seres humanos (CHAN & LEUNG, 2007).

Há mais de um século a PA é usualmente considerada como uma doença autodigestiva do pâncreas, acompanhada pela ativação prematura de proteases intracelulares (STEER et al., 1993). No entanto, são necessários maiores estudos para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos que condicionam esse fenômeno (SLEISENGER et al., 1998; SPIRO, 1993).

O mecanismo pelo qual a L-arginina induz PA ainda não está completamente elucidado. No entanto, seu efeito tóxico sobre o pâncreas deve-se em parte a inibição de síntese protéica, excessiva produção de óxido nítrico e peroxidação lipídica (CHAN & LEUNG, 2007). Algumas evidências sugerem que radicais livres de oxigênio, óxido nítrico e mediadores inflamatórios têm um papel chave nesse modelo (VARGA et al., 1997; CZAKO et al., 2000; TAKACS et al., 2002; RAKONCZAY et al., 2003).

Altas doses de L-arginina resultam no desenvolvimento de PA necrosante (MIZUNUMA et al., 1984). A partir de evidências experimentais foi observado que o

modelo de PA induzida por L-arginina está associado a um aumento significativo da amilase plasmática, da razão peso pancreático/peso corporal, dos níveis de IL-6, da atividade da MPO pancreática, ativação de tripsina, mudanças histológicas (incluindo acumulação de flúidos, destruição da histoarquitetura, vacuolização das células acinares, extensiva necrose de células acinares e infiltração neutrofílica). (CZAKO et al., 2000; DABROWSKI et al., 1999; HEGYI et al., 2004; RAKONCZAY et al., 2003; VARGA et al., 1997; ZHAO et al., 2004; DHARA et al., 2006; SZABOLCS et al., 2006a).

Em acréscimo às observações já mencionadas, o fator de transcrição NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , IL-6, PAF e radicais livres estão envolvidos na patogênese da pancreatite aguda induzida tanto por L-arginina, quanto por ceruleína (NONAKA et al., 1990; BATHIA et al., 2005 a,b; GRANGER & REMICK, 2005).

Determinações séricas de amilase e lipase são usadas como marcadores de pancreatite, uma vez que seus níveis elevados em pacientes são altamente sugestivos do desenvolvimento dessa doença (DAWRA et al., 2007). Após o início da inflamação pancreática, já nas primeiras horas, a amilase e lipase séricas elevam-se. A amilase sérica reduz-se mais rapidamente do que a lipase, e pode retornar à normalidade em até 24 horas. Por esse motivo, a lipase é melhor indicadora de pancreatite do que a amilase em pacientes que são avaliados vários dias após o início da crise pancreática (KOLAR et al., 1984).

No modelo experimental de PA por L-arginina os níveis séricos de amilase começam a elevar-se após 12 horas da administração de L-arginina, sendo o pico de elevação em torno de 24 horas. A lipase sérica também se encontra elevada nas 24h após a administração de L-arginina (SZABOLCS et al., 2006a).

Os resultados da presente investigação mostram que a L-arginina elevou os níveis séricos de amilase e lipase, em ratos, após 24 horas da sua administração, e que a mistura de α , β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg) é oralmente ativa na atenuação dos níveis séricos dessas enzimas, sugerindo uma atividade contra a pancreatite aguda, uma vez que está envolvida na redução dos níveis séricos de enzimas que participam da patogênese da PA. Metilprednisolona (30 mg/kg), controle positivo

utilizado nesse estudo também foi eficaz na redução dos níveis séricos de amilase e lipase. Estudos experimentais mostram que agentes glicocorticóides, semelhantes à metilprednisolona, são capazes de atenuar a inflamação do tecido pancreático, evidenciado pela redução dos níveis séricos de amilase (KANDIL et al., 2006).

Na PA, além da ativação de proteases digestivas, observa-se a presença de infiltrado de células inflamatórias, ativação leucocitária, liberação de mediadores inflamatórios e necrose celular acinar (BATHIA et al., 2005a; REGNER et al., 2008). A ativação intra-acinar prematura de enzimas digestivas é o evento central da patogênese dessa doença. A resposta inflamatória é parcialmente causada pela liberação de quimiocinas das células acinares, seguida pelo recrutamento de linfócitos T helper e macrófagos levando ao desenvolvimento de edema pancreático e acúmulo de neutrófilos. O estresse oxidativo está também envolvido na patogênese da doença pancreática (RAU et al., 2000; LEUNG & CHAN, 2009).

A literatura relata que o aumento da atividade de mieloperoxidase (MPO) de neutrófilos está presente em vários processos patológicos e está associado com um aumento do risco do estresse oxidativo, como no caso de enfermidades infecciosas, enfermidades inflamatórias e na isquemia de reperfusão (MORALES et al., 1998). A administração de L-arginina resulta em uma significativa infiltração de células inflamatórias, predominantemente neutrófilos, a qual está correlacionada com o aumento da atividade de MPO tecidual (DAWRA et al., 2007). A inibição da MPO é o um indicativo de atividade antiinflamatória (FUJII et al., 2002).

Os resultados mostram que a mistura de α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg), assim como a metilprednisolona (30 mg/kg), são efetivos em reduzir a migração de leucócitos polimorfonucleares, avaliado indiretamente através da determinação da atividade da MPO e pela análise histológica. Resultado que indica uma possível atividade antiinflamatória para a mistura de α,β - amirina.

Trabalhos anteriores têm sugerido que os neutrófilos estão envolvidos na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BABBS, 1992), e que a L-arginina e a ceruleína induzem a formação em excesso de EROs, seguida pela

ativação do fator de transcrição NF- κ B, aumentando, dessa forma, a expressão de TNF- α e outras citocinas (KIM et al., 2000; RAKONCZAY et al., 2008). O excesso de EROs e de espécies reativas de nitrogênio (ERN) produzidas pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), isoformas de NADPH oxidase, ou por bi-produtos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial tem sido implicado na patogênese da pancreatite aguda (LEUNG & CHAN, 2009). O estresse oxidativo é um processo deletério que pode ser um importante mediador dos danos às estruturas celulares, incluindo lipídios e membranas, proteínas enzimáticas e estruturais e DNA celular. Agentes antioxidantes semelhantes a N-acetilcisteína e raxofelast são eficientes em inibir a ativação de NF- κ B em modelos animais de pancreatite (RAKONCZAY et al., 2008).

É conhecido que as células acinares produzem grande quantidade de EROs nos estágios iniciais da PA em ratos. A produção dessas EROs pode ser aumentada na PA pela atividade leucocitária, levando a uma alteração no citoesqueleto das células acinares e danos às membranas celulares. A degradação de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas celulares que ocorre secundariamente ao excesso de produção de EROs, resulta na destruição da membrana e produção de malonaldeído (MDA), um indicador de geração de espécies reativas de oxigênio (DABROWSKI et al., 1988).

Portanto, EROs estão envolvidos como um importante fator na patogênese e progresso da PA. Como são espécies bioquímicas altamente reativas, exercem seus efeitos patofisiológicos pelo ataque direto a lipídios e proteínas nas membranas biológicas, causando sua disfunção (FARBER et al., 1990).

Trabalhos experimentais mostram que mecanismos semelhantes ao estresse oxidativo está envolvido no desenvolvimento da PA (SALUJA et al., 1985; SCHOENBERG et al., 1994; SANFEY et al., 1985, 2000; RAU et al., 2000). Contudo, a medida de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) é usada para avaliar a lipoperoxidação, ou seja, quando os lipídios sofrem ação dos radicais livres. TBARS reflete a quantidade de malonaldeído (MDA) formado, produto final da peroxidação dos ácidos graxos da membrana (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2001).

Neste estudo, foi observado que a L-arginina aumenta o estresse oxidativo, como comprovado pela formação aumentada de TBARS no pâncreas, um indicador de peroxidação lipídica. A mistura de α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg) e metilprednisolona (30 mg/kg) potencialmente suprimiram a lipoperoxidação, evidenciado pela redução da formação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Evento que reflete uma possível atividade antioxidante para a mistura de α,β -amirina, que pode resultar em inibição do fator de transcrição NF- κ B e redução da síntese de mediadores inflamatórios.

Estudos preliminares mostram que a mistura de α,β -amirina é capaz de reduzir a formação aumentada de TBARS em modelo experimental de periodontite aguda (HOLANDA PINTO, 2008). A literatura relata ainda uma atividade antioxidante da resina de *P. Heptaphillum* e da mistura de α,β -amirina em modelo de lesões gástricas induzida por etanol e atividade antioxidante da mistura de α,β -amirina em modelo de lesão hepática induzida por acetaminofeno (OLIVEIRA et al., 2004a e 2005).

Nesse contexto, o papel do estresse oxidativo na pancreatite aguda tem sido estudado em vários modelos animais (DING et al., 2003; SALUJA et al., 1985; SANFEY et al., 1985; URUNUELA et al., 2002) e em seres humanos (PARK et al., 2003). Trabalhos prévios têm indicado que agentes antioxidantes, tais como: melatonina, retinol, ácido ascórbico e N-acetilcisteína apresentam efeitos benéficos no tratamento da PA induzida por L-arginina e ceruleína (SZABOLCS et al., 2006a; PARK et al., 2003; JAWOREK et al., 2003; QI et al., 1999).

Uma importante característica da pancreatite aguda é a inflamação pancreática seguida de recrutamento de leucócitos que associado aos mediadores inflamatórios apresentam um papel crítico na patogênese da PA (BATHIA et al., 2000; BATHIA, 2002 e 2004). Estudos experimentais mostram que citocinas apresentam um papel importante na PA, assim como provocam uma ativação inapropriada do sistema imune, aumentando a severidade da doença local e das complicações sistêmicas (RINDERKNECHT, 1988). Portanto, a infiltração de

leucócitos e liberação de mediadores pelas células acinares apresentam um papel central na amplificação do processo inflamatório.

Dentre os mediadores pró-inflamatórios que, acredita-se, estarem envolvidos na patofisiologia da PA, podem-se citar: TNF- α , IL-1 β , IL-6, PAF, ICAM-1 e IL-8. A expressão de vários desses mediadores é regulada pelo fator de transcrição NF- κ B (ALGUL et al., 2002; MERCURIO et al., 1999). A inibição de NF- κ B atenua a severidade ou melhora a sobrevivência em diferentes modelos experimentais de PA (ETHRIDIGE et al., 2002; DUNN et al., 1997). TNF- α e IL-6 estão aumentadas tanto na pancreatite experimental, quanto na pancreatite humana (DE BEAUX et al., 1996; GUKOVSKAYA et al., 1997; NORMAN et al., 1997). A literatura relata que TNF- α apresenta um papel central no desenvolvimento da PA severa, atuando nos estágios iniciais da doença em curso (MALLEO et al., 2007) e IL-6 constitui o principal mediador na síntese de proteínas de fase aguda (PAPACHRISTOU, 2008).

Os níveis de TNF- α estão elevados no início e durante o progresso da PA experimental (BHATIA, 2002; BHATIA et al., 2005; NORMAN et al., 1995 e HIROTA et al., 2000) e a inibição de TNF- α , assim como a neutralização do TNF- α com um anticorpo policlonal, atenua a severidade da PA experimental (HUGHES et al., 1996; BHATIA et al., 2005). O TNF- α pode ser determinado no plasma, bem como no tecido pancreático (de BEAUX et al., 1996; POORAN et al., 2003).

Nesse estudo, os resultados mostram que o pré-tratamento dos ratos com a mistura de α , β - amirina (10, 30 e 100 mg/kg) e metilprednisolona (30mg/kg) atenuou os níveis de TNF- α sérico, assim como a expressão de TNF- α no tecido pancreático, induzido pela administração de L-arginina.

A IL-6 possui alta especificidade e sensibilidade em distinguir a PA leve da grave apresentando correlação com as taxas de mortalidade. Quando associada à elevação de lipase sérica, melhora ainda mais a acurácia do diagnóstico e prognóstico (PEZZILLI et al., 1995). Níveis plasmáticos de IL-6 correlacionam-se com anormalidades hemodinâmicas na PA em coelhos (JAMBRIK et al., 2002).

Camundongos transgênicos que expressam IL-6 humana são mais susceptíveis a PA, e o uso de anticorpo monoclonal anti-IL-6 exerce um efeito protetor na PA (SUZUKI et al., 2000). Trabalhos prévios mostraram que um significativo aumento da atividade de MPO associado ao aumento de IL-6 no pâncreas está associado à iniciação do processo inflamatório no pâncreas, bem como que IL-6 é uma importante citocina inflamatória no modelo de PA induzida por L-arginina (SZABOLCS et al., 2006a).

Níveis séricos elevados de IL-6 também foram observados após a administração de L-arginina em ratos e o pré-tratamento com a mistura de α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg) e metilprednisolona (30mg/kg) atenuou os níveis séricos de IL-6.

A literatura mostra que muitos triterpenos pentacíclicos, que possuem estrutura química semelhante à α,β -amirina, tais como ácido boswellico, ácido oleanólico e ácido ursólico, exercem sua atividade antiinflamatória por inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12, através da inibição de fatores de transcrição, como o NF- κ B (BANSKOTA et al., 2000; SYROVETS et al., 2005; SHISHODIA et al., 2003).

Estudos recentes mostraram que a mistura de α,β -amirina e a α -amirina tem capacidade de inibir a ativação de NF- κ B (MEDEIROS et al., 2007; VITOR et al., 2008) assim como os níveis de TNF- α em modelo experimental de periodontite aguda (HOLANDA PINTO et al., 2008).

Como a mistura de α,β -amirina foi hábil em atenuar os níveis séricos de TNF- α e IL-6, sugere-se que a atividade deste triterpeno pentacíclico em modelo experimental de pancreatite aguda se deve a inibição de citocinas pró-inflamatórias, que pode ser, em parte, mediada pela inibição de NF- κ B, uma vez que compostos com estrutura química semelhante, tais como ácido boswellico, ácido oleanólico e ácido ursólico, exercem sua atividade antiinflamatória por inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias.

Citocinas pró-inflamatórias e endotoxinas induzem a expressão da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), culminando com a produção de grande quantidade de óxido nítrico (NO) (MONCADA et al., 1991), o qual está implicado na patofisiologia da pancreatite aguda (DIMAGNO, 2007). A iNOS pode ter um importante papel pró-inflamatório na pancreatite (AL-MUFI et al., 1998; TSUKAHARA et al., 1996).

Estudos sugerem que a liberação de citocinas de alguns tipos de células é dependente do dano à membrana celular mediado pelo NO (VALLETTE et al., 1997). O aumento da produção de NO poderia, no entanto, resultar na ativação de uma alça de alimentação positiva para as células inflamatórias, em que o NO aumentaria a síntese de citocinas, como IL-1 β e TNF- α , que por sua vez poderiam induzir a expressão de iNOS (MARCINKIEWICZ et al., 1995).

A pancreatite aguda induzida por doses suprafisiológicas de L-arginina induz um aumento da expressão e atividade de iNOS (SCHIELDS et al., 2006). Hipótese, essa, consistente com a observação desse estudo que mostrou um aumento da expressão de iNOS induzido pela administração de L-arginina e que α,β -amirina, assim como metilprednisolona, reduzem a expressão dessa enzima.

Estudos experimentais mostraram que camundongos deficientes de iNOS apresentam resistência para a pancreatite aguda, sugerindo um papel deletério de iNOS/NO na patogênese dessa doença e que o L-NAME, um inibidor não específico de NOS, significativamente previne o desenvolvimento de pancreatite aguda (CUZZOCREA, 2002). Essas observações sugerem que α,β -amirina regula a severidade da pancreatite indiretamente pela modulação da expressão de iNOS/NO.

A produção de NO, que ocorre como conseqüência do aumento de expressão de iNOS, pode estar envolvida com o estresse oxidativo no pâncreas. Assim, contribuindo para a provável iniciação e progressão da inflamação pancreática (ANG et al., 2009).

O exato mecanismo pelo qual L-arginina leva ao desenvolvimento da PA não está completamente esclarecido, no entanto, sabe-se que L-arginina é um

precursor da síntese de NO, o qual contribui para a patogenia da PA (DAWRA et al., 2006). Nesse estudo, foi observado que L-arginina induz um aumento dos níveis de NO, quantificado indiretamente através da produção de nitrato/nitrito.

A mistura de α,β -amirina em todas as doses testadas e metilprednisolona (30 mg/kg) causaram uma significativa inibição na produção de nitrato/nitrito, metabólitos estáveis do óxido nítrico cuja determinação nos fluidos biológicos tem sido utilizada para estimar a produção de NO. Esta inibição na produção de nitrato/nitrito evidenciada no modelo de PA induzida por L-arginina pode estar associada a uma possível inibição da expressão de iNOS.

A interação de NO com o ânion superóxido leva a formação de peroxinitrito, um potente agente oxidante, que, por sua vez, se decompõe em outras espécies reativas de oxigênio, as quais reagem com resíduos de tirosina para formar nitrotirosina (BECKMAN et al., 1992). A presença de nitrotirosina em proteínas representa um marcador de formação endógena de peroxinitrito.

No presente estudo, a mistura de α,β -amirina em todas as doses testadas e metilprednisolona preveniram a formação de peroxinitrito no modelo de pancreatite aguda induzida por L-arginina, que foi evidenciado pela diminuição da expressão de nitrotirosina nas células pancreáticas. Essa observação associada à diminuição da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico reforça a hipótese de que a atividade de α,β -amirina se deve em parte por uma ação antioxidante.

Em resposta a inflamação da pancreatite aguda, pode-se observar o desenvolvimento de edema pancreático. Nesse estudo, a L-arginina induziu a formação de edema pancreático, evidenciado pelo aumento da relação peso do pâncreas/peso do animal e pela análise histopatológica. A mistura de α,β -amirina (10, 30 e 100mg/kg) e a metilprednisolona (30 mg/kg) foram hábeis em atenuar a formação do edema.

Além das observações já relatadas a PA está associada a mudanças histológicas, incluindo: acúmulo de fluidos, destruição da histoarquitetura das células

acinares, vacuolização, necrose acinar, hemorragia e infiltração neutrofílica (SCHMIDT et al., 1992; DING et al., 2003). Relembrando a doença que acomete seres humanos.

Estudos prévios demonstraram que a L-arginina leva ao desenvolvimento de alterações morfológicas semelhantes as que ocorrem na pancreatite aguda, tais como necrose das células acinares, em ratos (TAKÁCS et al.; 1996; VARGA et al.; 1997). Essas alterações podem ser pelo menos em parte mediadas pelo estresse oxidativo pancreático (BRAGANZA, 1990).

No presente estudo, a L-arginina foi responsável pelo desenvolvimento de alterações histológicas no tecido pancreático, tais como: edema, vacuolização das células acinares, infiltrado inflamatório, necrose e hemorragia. A mistura de α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg) e metilprednisolona (30 mg/kg) atenuaram as alterações histológicas observadas.

Metilprednisolona, controle positivo utilizado nesse estudo, é uma potente glicocorticóide antiinflamatório. Estudos experimentais mostram que os glicocorticóides atenuam a síntese, liberação e ação de citocinas inflamatórias pela inibição da ativação do fator de transcrição NF- κ B (ADOCK et al., 1994; SCHEINMAN et al., 1995). Antagonistas de glicocorticóides amplificam o processo inflamatório e aumentam a produção de IL-6 e TNF- α (PASZT et al., 2004; LAZAR et al., 1992).

Nossos resultados demonstram que em relação à pancreatite aguda induzida por L-arginina, a mistura de α,β -amirina foi capaz de reduzir de forma significativa a resposta inflamatória aguda por mecanismos antioxidantes e de redução da infiltração pancreática de células inflamatórias e redução da produção de mediadores inflamatórios.

Com o intuito de caracterizar a atividade potencial da mistura de α,β -amirina em modelos experimentais de pancreatite aguda foi avaliada a ação desses triterpenos pentacíclicos no modelo de pancreatite aguda induzida por ceruleína.

A ceruleína, análogo da colecistocinina (CCK), induz pancreatite aguda em camundongos atuando através dos receptores de colecistocinina, levando a uma exagerada estimulação das células acinares seguida por uma prematura ativação do tripsinogênio e degradação lisossomal de organelas intracelulares nos vacúolos autofágicos nas células acinares, bem como por um marcado edema intersticial (NIEDARAU et al., 1990; WISNER et al., 1988; SALUJA et al., 1985; WATANABE et al., 1984). A ativação do tripsinogênio e de outros zimogênios são responsáveis pela iniciação de uma série de eventos ativados por proteases. As enzimas digestivas uma vez ativadas degradam proteínas celulares, incluindo proteínas estruturais (como F-actin), o que eventualmente leva a uma autodigestão pancreática (CHAN & LEUNG, 2007).

O modelo de PA induzido por doses suprafisiológicas de ceruleína é acompanhado por 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 (MALLEO et al., 2007; GÓMEZ et al., 2006). Alterações essas que podem ser observadas 24 horas após a administração de ceruleína (MALLEO et al., 2007). Esse modelo reproduz as características da PA que acomete seres humanos (VAN WESTERLOO et al., 2003).

O presente estudo demonstrou que a mistura dos triterpenos α,β -amirina atenuam a severidade da PA induzida por ceruleína em camundongos. Em particular, foi demonstrado que o pré-tratamento com α,β -amirina reduz a inflamação pancreática, assim como a injúria tecidual associada, através da redução dos níveis de amilase e lipase séricas, redução da infiltração de neutrófilos, redução da peroxidação lipídica, melhora das alterações histológicas, redução da produção de citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6 e redução da expressão de TNF- α e iNOS.

O aumento sérico de amilase e lipase são observados em consequência da administração de ceruleína em camundongos (EŞREFOĞLU et al., 2006). Essas

observações estão de acordo com o nosso estudo, onde após 24 horas da administração de ceruleína em camundongos foi observada uma elevação dessas importantes enzimas pancreáticas (DAWRA et al., 2007).

O pré-tratamento com a mistura de α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg) foi eficaz em reduzir os níveis séricos de amilase, em resposta a administração de ceruleína em camundongos. Os níveis séricos de lipase elevados pela administração de ceruleína, apenas foi reduzido por α,β -amirina na dose de 100 mg/kg. Talidomida (200mg/kg), controle positivo utilizado nesse modelo, também foi eficaz na redução dos níveis séricos de amilase e lipase.

Uma importante característica secundária a administração de ceruleína é o aumento do recrutamento de neutrófilos no pâncreas (SONG et al., 2002). A atividade de MPO, indicativa de ativação e sequestro de neutrófilos, foi avaliada na tentativa de determinar a habilidade de α,β -amirina sobre o infiltrado de células inflamatórias.

Os resultados mostram que a mistura de α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg), assim como a talidomida (200 mg/kg), atenuaram a migração de leucócitos polimorfonucleares, uma vez que reduziram a atividade de mieloperoxidase. Resultados que indicam uma prevenção contra a infiltração neutrofílica no pâncreas e conseqüentemente uma diminuição da injúria pancreática.

Estudos prévios mostraram que o modelo de PA induzida por ceruleína em ratos está associado a um aumento da concentração de radicais de oxigênio e de produtos de peroxidação lipídica nas fases iniciais do processo inflamatório (GOUGH et al., 1990; DABROWSKI et al., 1988; SCHOENBERG et al., 1989). Portanto, espécies reativas de oxigênio apresentam um papel importante no desenvolvimento da PA induzida por ceruleína (EŞREFOĞLU et al., 2006). O exato mecanismo da patogenia da PA não é claramente entendido, mas evidências sugerem que o dano pancreático seja devido aos efeitos tóxicos de EROs (PARK et al., 2003; DABROWISKI et al., 1999). Altas concentrações de EROs estão associados a formação de malonilaldeído (MDA). Entretanto, a determinação de TBARS, usada para avaliar a lipoperoxidação, reflete a quantidade de malonaldeído

(MDA) formado, um produto final da peroxidação dos ácidos graxos da membrana (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2001).

No presente estudo, foi observado que a ceruleína aumentou o estresse oxidativo, como comprovado pela formação aumentada de TBARS no pâncreas, um indicador de peroxidação lipídica. A mistura de α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg) e a talidomida (200 mg/kg) apresentaram efeitos benéficos em relação à lipoperoxidação, evidenciado pela redução da formação de TBARS.

A observação de que a mistura de α,β -amirina atenua o estresse oxidativo no modelo de PA induzida por ceruleína, pela supressão de TBARS, associado à redução do recrutamento de neutrófilos, determinado indiretamente pela atividade de MPO, bem como as ações desses triterpenos pentacíclicos sobre a PA induzida por L-arginina reforça a hipótese de uma atividade antioxidante para o composto em questão. Atividade, essa, consistente com o que a literatura relata para conhecidas substâncias antioxidantes, tais como: melatonina, N-acetilcisteína e ácido ascórbico, que apresentam efeitos promissores no modelo de PA induzida por ceruleína (BARLAS et al., 2004; JAWOREK et al., 2003; GOMEZ-CAMBRONERO et al., 2000).

Estudos realizados com a mistura de α,β - amirina e com α -amirina observou-se a capacidade dessas substâncias em inibir o NF- κ B (MEDEIROS et al., 2007; VITOR et al., 2008). N-acetilcisteína, raxofelast e ditiocarbamato de pirrolidina, agentes antioxidantes, são eficientes inibidores da ativação do fator de transcrição NF- κ B em modelos animal de pancreatite (RAKONCZAY et al., 2008). Contudo, a atividade de α,β -amirina em melhorar a PA induzida por ceruleína se deve em parte por uma ação antioxidante e conseqüente supressão de NF- κ B.

EROs levam a um aumento da expressão de TNF- α no modelo de PA induzida por ceruleína secundariamente a ativação do fator de transcrição NF- κ B (KIM et al., 2000). TNF- α apresenta um papel central no desenvolvimento da PA e IL-6 constitui o principal mediador na síntese de proteínas de fase aguda (MALLEO

et al., 2007; PAPACHRISTOU, 2008). Caracterizando a importância do estudo dessas citocinas em modelos experimentais de PA.

Os resultados mostram que o pré-tratamento dos camundongos com a mistura de α,β -amirina (10, 30 e 100 mg/kg) e talidomida (200 mg/kg) atenuaram o aumento de TNF- α e IL-6 séricos secundários à administração de ceruleína, assim como reduziram a expressão de TNF- α no tecido pancreático, avaliado por técnica de imunohistoquímica.

A pancreatite aguda induzida por doses suprafisiológicas de ceruleína induz um aumento da expressão e atividade de iNOS (ANG, et al., 2009). Relato consistente com a observação desse estudo que mostrou um aumento da expressão de iNOS induzido pela administração de ceruleína e que α,β -amirina, assim como talidomida reduzem a expressão dessa enzima.

As EROs, enzimas pancreáticas ativadas, citocinas e neutrófilos estão associados ao aumento da permeabilidade capilar e formação de edema (DABROWSKI et al., 1999). O edema pancreático foi determinado nesse estudo pelo aumento da razão entre o peso do pâncreas/peso do animal. A ceruleína apresentou habilidade em induzir a formação de edema pancreático, o qual foi atenuado pela mistura de α,β -amirina (30 e 100mg/kg) e pela talidomida (200 mg/kg). O edema pancreático, assim como outras alterações no tecido pancreático, pode ser confirmado por histologia. No presente estudo, a ceruleína foi responsável por alterações histológicas do tecido pancreático, tais como edema, vacuolização das células acinares, infiltrado inflamatório e necrose. A mistura de α,β -amirina (100 mg/kg) e talidomida (200 mg/kg) atenuaram as alterações histológicas observadas.

Nossos resultados demonstram que assim como na PA induzida por L-arginina, na PA induzida por ceruleína, a mistura de α,β -amirina reduziu de forma significativa a resposta inflamatória aguda por mecanismos antioxidantes e de redução da infiltração pancreática de células inflamatórias e redução da produção de mediadores inflamatórios.

Muitos triterpenóides com atividade antiinflamatória, derivados de plantas, incluindo derivados do oleanano e ursano foram descritos previamente por atuarem como inibidores competitivos de serina proteases, tripsina e quimiotripsina, que apresentam um papel chave no desenvolvimento da pancreatite aguda (RAJIC et al., 2001; GRANGER & REMICK, 2005). Efeito esse pode também estar envolvido na atividade da mistura de α,β -amirina no modelo de PA, uma vez que essa mistura de triterpenos apresenta semelhança estrutural aos triterpenos oleanano e ursano, contudo estas atividades ainda precisam ser pesquisadas.

Talidomida, o controle positivo usado nesse modelo é um derivado sintético do ácido glutâmico que inibe a produção de TNF- α , modula a adesividade microvascular, através da modificação das moléculas de adesão da superfície celular e suprime a atividade de NF- κ B (SAMPAIO et al., 1991; MOREIRA et al., 1993; YASUI et al., 2005). Talidomida mostrou melhora da lesão pancreática similarmente a mistura de α,β -amirina. Esse achado está de acordo com as observações de Malleo et al. (2007) que mostrou a eficácia de talidomida no modelo de pancreatite aguda experimental induzida por ceruleína.

Tanto na PA induzida por L-arginina, quanto na PA induzida por ceruleína foram observadas alterações bioquímicas (aumento sérico de amilase, lipase, IL-6 e TNF- α , aumento de MPO, TBARS e nitrato/nitrito) e histológicas (edema, infiltrado inflamatório, vacuolização, necrose e hemorragia) características de processo inflamatório, as quais foram significativamente atenuadas pelo pré-tratamento com a mistura de α,β -amirina, esses achados ampliam o espectro das ações antiinflamatórias e antioxidantes já estudadas para o composto em questão.

Estudos mostram que a inervação neural do pâncreas pode exercer um papel importante da iniciação e manutenção da resposta inflamatória na injúria pancreática. O pâncreas é inervado pelo vago, neurônios simpáticos e parassimpáticos assim como neurônios sensoriais (NIEBERGALL-ROTH & SINGER, 2001). A ativação de neurônios sensoriais primários pancreáticos causa a liberação de neuropeptídeos vasoativos e inflamatórios, como bradicinina, CGRP e substância P, responsáveis pelo extravasamento plasmáticos e infiltração neutrofílica (KIRCHGESSNER & LIU, 2000; LARSSON, 1979; SEIFERT et al., 1985). Os neurônios sensoriais primários do pâncreas expressam receptores TRPV1 cuja

ativação induz inflamação pancreática (LIDDLE, 2007). O bloqueio desses receptores, pela capzasepina, melhora significativamente a pancreatite experimental (NATHAN et al., 2001).

Apesar de não ter sido objetivo deste trabalho o estudo do envolvimento dos receptores TRPV1 na ação da mistura de α,β -amirina nos modelos de pancreatite, estudos preliminares realizados em nosso laboratório demonstraram que esta mistura de triterpenos é capaz de inibir os receptores TRPV1 em modelo experimental de inflamação e nocicepção visceral (LIMA-JÚNIOR et al., 2006 e 2007). Possivelmente o bloqueio dos receptores TRPV1 pela mistura de α,β -amirina pode está auxiliando na sua ação antiinflamatória na pancreatite experimental, contudo experimentos são necessários para comprovar esta participação.

Apesar da relevância da PA, não existe um tratamento eficaz para essa doença. Contudo, pesquisas, utilizando produtos naturais (extratos de plantas, componentes como flavonóides, triterpenos, antraquinonas, dentre outros) têm sido realizadas na busca de novas estratégias terapêuticas para a doença. A literatura relata que esses compostos apresentam atividade na PA por mecanismos que envolvem atenuação de alterações histológicas, diminuição da atividade de MPO, inibição da ativação de NF- κ B, redução dos níveis séricos de amilase, lipase, IL-6 e TNF- α e inibição de proteases. Nesse trabalho vimos que a mistura de α, β -amirina atenua a severidade da PA por mecanismos semelhantes aos já estudados para outros compostos naturais. Entretanto, pode-se sugerir que esses compostos podem contribuir para o desenvolvimento de drogas terapêuticas para o tratamento da PA, uma vez que eles atenuam importantes alterações observadas em modelos experimentais de PA.

Estudos futuros poderão ser realizados para caracterizar a atividade desses triterpenos pentacíclicos em relação aos mecanismos nociceptivos envolvidos, uma vez que a dor em decorrência da PA é bastante intensa e de difícil tratamento, representando uma relevante característica clínica dessa doença.

8. CONCLUSÕES

- ❖ Este trabalho reproduziu o modelo de pancreatite aguda induzida por L-arginina e por ceruleína descrito na literatura evidenciado por alterações bioquímicas, inflamatórias e histopatológicas;
- ❖ A mistura de α,β -amirina reduziu a resposta inflamatória nos modelos de pancreatite aguda induzido por L-arginina e por ceruleína, o que foi evidenciado através de alterações bioquímicas (amilase e lipase) e histopatológicas. Apesar de ter representado uma diferença significativa ($p < 0,05$), a amilase sérica foi pouco afetada nos dois modelos. A lipase sérica sofreu uma grande elevação em resposta à administração de L-arginina;
- ❖ Foi observado um aumento do recrutamento de neutrófilos em decorrência da administração de L-arginina e ceruleína, evidenciado através da determinação da atividade de MPO e análise histopatológica, o qual foi atenuado em virtude do pré-tratamento com a mistura de α,β -amirina. A redução da atividade de MPO pode ser interpretada como uma manifestação de atividade antioxidante, o aumento da atividade de MPO foi um dos parâmetros mais afetados na PA induzida por ceruleína;
- ❖ A mistura de α,β -amirina atenuou todos os parâmetros avaliados em ambos os modelos experimentais de pancreatite aguda, por seu potente efeito antiinflamatório e antioxidante;
- ❖ A mistura de α,β -amirina demonstrou atividade antiinflamatória nos modelos de pancreatite aguda induzida por L-arginina e ceruleína através da redução dos níveis séricos de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-6). E redução da expressão tecidual de TNF- α ;

- ❖ A mistura de α,β -amirina foi eficaz em reduzir a expressão de iNOS em ambos os modelos experimentais, sugerindo que a atividade antiinflamatória desse triterpeno possa ser secundária a inibição de citocinas e iNOS;
- ❖ No modelo de pancreatite aguda induzida por L-arginina foi observado um aumento de óxido nítrico, quantificado indiretamente através da determinação de nitrato/nitrito. A mistura de α,β -amirina foi eficaz em atenuar os níveis de nitrato/nitrito. Sugerindo que a inibição de iNOS/NO esteja envolvido na atividade antiinflamatória de α,β -amirina;
- ❖ No modelo de pancreatite aguda induzida por L-arginina, a mistura de α,β -amirina significativamente reduziu a formação de peroxinitrito, quantificado indiretamente por imunohistoquímica a partir da expressão de nitrotirosina no tecido pancreático. Evidência que reforça uma possível atividade antioxidante para este composto;
- ❖ Foi observado que a mistura de α,β -amirina atenuou o edema inflamatório formado em resposta a administração de L-arginina e ceruleína;
- ❖ L-arginina e ceruleína levaram a mudanças significativas da histologia pancreática, como: vacuolização, edema, necrose, infiltrado inflamatório e hemorragia. A mistura de α,β -amirina foi eficaz em atenuar essas alterações;
- ❖ A partir dos dados apresentados, Conclui-se, que a atividade da mistura de α,β -amirina seja devida a uma atividade antioxidante e antiinflamatória desse composto, como evidenciado pela redução de: recrutamento de neutrófilos, peroxidação lipídica, citocinas inflamatórias e iNOS;
- ❖ Esse trabalho demonstrou a habilidade da mistura de α,β -amirina em melhorar a PA experimental induzida tanto por L-arginina quanto por ceruleína. A demonstração da atividade desse composto nos dois modelos é importante uma vez que a L-arginina na dose utilizada é responsável apenas por complicações locais envolvidas na PA, enquanto que a PA induzida por ceruleína está também associada a complicações sistêmicas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADCOCK, I.M.; SHIRASAKI, H.; GELDER, C.M. The effect of glucocorticoidson phorbol ester and cytokine stimulated transcription factor activation in human lung. **Life Sci.**, v. 55, p. 1147-1153, 1994.

AHMED, S.A.; WRAY, C.; RILO H.L. Chronic pancreatitis: recent advances and ongoing challenges. **Curr Probl Surg**, v. 43, p. 127-238, 2006.

ALGUL, H.; TANDO, Y.; SCHNEIDER, G.; WEIDENBACH, H.; ADLER, G.; SCHMID, R.M. Acute experimental pancreatitis and NF-kappaB/Rel activation. **Pancreatology**, v. 2, p. 503–509, 2002.

AL-MUFTI, R.A.; WILLIAMSON, R.C.; MATHIE, R.T. Increased nitric oxide activity in a rat model of acute pancreatitis. **Gut**, v. 43, p. 564–570, 1998.

AMOROZO, M.C.M.A. **Abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996.

AMMANN R.W.; AKOVBIANTZ A.; LARGIADER F.; SCHUELER G. Course and outcome of chronic pancreatitis. Longitudinal study of a mixed medical-surgical series of 245 patients. **Gastroenterology**, v. 86, p. 820-828, 1984.

AMMANN, R.W.; MUELLHAUPT, B. Progression of alcoholic acute to chronic pancreatitis. **Gut.**, v.35, p. 552-556, 1994.

ANDERSSON, R.; SWÄRD, A.; TINGSTEDT, B.; AKERBERG, D. Treatment of acute pancreatitis: focus on medical care. **Drugs**. v. 69 (5), p. 505-514, 2009.

ANG, A.D.; ADHIKARI, S.; NG, S.W.; BHATIA, M. Expression of Nitric Oxide Synthase Isoforms and Nitric Oxide Production in Acute Pancreatitis and Associated Lung Injury. **Pancreatology**, v. 9, p.150–159, 2009.

ARAGÃO, G.F. (2004). Atividade anti-inflamatória, anti-agregante plaquetária e efeitos centrais de alfa e beta amirina isolada de *Protium heptaphyllum* (Aubl) March. **Mestrado**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

ARAGÃO, G.F.; CARNEIRO, L.M.; JUNIOR, A.P.; VIEIRA, L.C.; BANDEIRA, P.N.; LEMOS, T.L.; VIANA, G.S. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 85(4), p. 827-834, 2006.

ASAUMI, H.S.; WATANABE, M.; TAGUCHI, M.; TASHIRO, Y.; NAGASHIO, Y.; NOMIYAMA, H.; NAKAMURA; OTSUKI, M. Green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate inhibits ethanol-induced activation of pancreatic stellate cells. **European Journal of Clinical Investigation**, v.36, p. 113-122, 2006.ishing Ltd

AYOUB W.A.; KUMAR A.A.; NAGUIB H.S.; TAYLOR H.C. Exenatide Induced Acute Pancreatitis. **Endocr Pract.** v. 24, p. 1-16, 2009.

BABBS, C.F. Oxygen radicals in ulcerative colitis. **Free radic Biol Med.**, v. 13, p. 169-181, 1992.

BABU, B.I.; MALLEO, G.; GENOVESE, T.; MAZZON, E.; DI PAOLA, R.; CRISAFULLI, C.; CAMINITI, R.; SIRIWARDENA, A.K.; CUZZOCREA, S. Green Tea Polyphenols Ameliorate Pancreatic Injury in Cerulein-Induced Murine Acute Pancreatitis. **Pancreas.** v. 6, 2009.

BAKKER, O. J.; SANTVOORT, H.C.V.; BESSELINK, M.G.H.; DER HARST, E.V.; HOFKER, H.S.; GOOSZEN, H.G. Prevention, detection, and management of infected necrosis in severe acute pancreatitis. **Current Gastroenterology Reports**. v. 11 (2), p. 104-110, 2009.

BALAKRISHNAN, V.; NAIR, P.; RADHAKRISHNAN, L.; NARAYANAN, V.A. Tropical pancreatitis - a distinct entity, or merely a type of chronic pancreatitis? **Indian J Gastroenterol**, v. 25, p. 74-81, 2006.

BANDEIRA, N.P.; MACHADO, M.I.L.; CAVALCANTI, F.S.; LEMOS, T.L.G. Essential Oil Composition of Leaves, Fruits and Resin of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **J. Essent. Oil. Res**, v. 13, p. 33, 2001.

BANDEIRA, P.N.; PESSOA, O.D.L.; TREVISAN, M.T.S.; LEMOS, T.L.G. Metabólitos Secundários de *Protium heptaphyllum* March. **Quim. Nova**, v. 25, p. 1078-1080, 2002.

BANG, U.C.; SEMB, S.; NOJGAARD, C.; BENDTSEN, F. Pharmacological approach to acute pancreatitis. **World J Gastroenterol**, v. 14, p. 2968-2976, 2008

BANK, S., WISE, L. & GERSTEN, M. – Risk factors in acute pancreatitis. **Am J Gastroenterol**, v. 78, p. 637-640, 1983.

BANK, P.A. Practice guidelines in acute pancreatitis. **Am J Gastroenterol**, v. 92, p. 377- 386, 1997.

BANKS, P.A.; FREEMAN, M.L. Practice guidelines in acute pancreatitis. **Am J Gastroenterol**, v. 101, p. 2379-2400, 2006.

BANSKOTA, A.H.; TEZUCA, Y.; ADNYANA, I.K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A.A.; KADOTA, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of própolis from Brazil, Peru, the Netherlands and Chine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 239-246, 2000.

BARLAS, A.; CEVIK, H.; ARBAK, S.; BANGIR, D.; SENER, G.; YEGEN, C.; YEGEN, B.C. Melatonin protects against pancreaticobiliary inflammation and associated remote organ injury in rats: role of neutrophils. **J Pineal Res**, v. 37, p. 267-275, 2004.

BARRACA, A.S. Contribuição: Relatório do Estágio Supervisionado em Produção Vegetal II. "Manejo e produção de plantas medicinais e aromáticas". 1999. ESALQ/USP. Piracicaba. Disponível em [www.ciagri.usp.br/planmedi/ confrei.html](http://www.ciagri.usp.br/planmedi/confrei.html), acesso em maio de 2004.

BASSI, C.; BUTTURINI, G.; FALCONI, M.; SALVIA, R.; FRIGERIO, I.; PEDERZOLI, P. Outcome of open necrosectomy in acute pancreatitis. **Pancreatology**, v. 3, p. 128–132, 2003.

BECKMAN, J.S.; YE, Y.Z.; ANDERSON, P.G. Extensive nitration of phenolics by peroxynitrite. **Arch Biochem Biophys**, v. 288, p. 438-444, 1992.

BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p.1424-1437, 1996.

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.

BEGER, H.G.; RAU, B.M.R.; JPRALLE, U. Natural course of pancreatitis. **World J Surg**, v. 21, p. 130-135,1997.

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.; BRADY, M.; SHOKUHI, S.; CHRISTMAS, S.; NEOPTOLEMOS, J.P.; SLAVIN, J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. **J Pathol.**, v. 190, p. 117-125, 2000.

BHATIA, M.; NEOPTOLEMOS, J.P.; SLAVIN, J. Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 2, p. 496-501, 2001.

BHATIA M. Novel therapeutic targets for acute pancreatitis and associated multiple organ dysfunction syndrome. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 1, p. 343-351, 2002.

BHATIA, M.; SLAVIN, J.; CAO, Y.; BASBAUM, A.I.; NEOPTOLEMOS, J.P. Preprotachykinin-A gene deletion protects mice against acute pancreatitis and associated lung injury. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 284, p. 830-836, 2003.

BHATIA, M. Apoptosis of pancreatic acinar cells in acute pancreatitis: is it good or bad? **J Cell Mol Med.**, v. 8(3), p. 402-409, 2004.

BHATIA, M. Novel therapeutic targets for acute pancreatitis and associated multiple organ dysfunction syndrome: An update. **Medicinal Chemistry Reviews – Online**, v. 1, p. 25-26, 2004.

BHATIA, M.; SIDHAPURIWALA, J.; MOOCHHALA, S.M.; MOORE, P.K. Hydrogen sulfide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw edema in the rat. **Br J Pharmacol.**, v. 145, p. 141-144, 2005.

BHATIA, M.; WONG, F.L.; CAO, Y.; LAU, H.Y.; HUANG, J.; PUNEET, P.; CHEVALI, L. Pathophysiology of acute pancreatitis. **Pancreatology.**, v. 5(2-3), p. 132-144, 2005a.

BHATIA, M.; WONG, F.L.; FU D.; LAW H.Y.; MOOCHHALA, S.M.; MOORE PK. Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury. **FASEB J.**, v. 19, p. 623-625, 2005b.

BHATIA, M.; HEGDE, A. Treatment with antileukinate, a CXCR2 chemokine receptor antagonist, protects mice against acute pancreatitis and associated lung injury. **Regul Pept.**, v. 138 (1), p. 40-48, 2007.

BRADY, M.; BHATIA, M.; CHRISTMAS, S.; BOYD M.T.; NEOPTOLEMOS, J.P.; SLAVIN, J. Expression of the chemokines MCP-1/JE and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in early acute pancreatitis. **Pancreas.**, v. 25 (3), p. 260-269, 2002.

BRAGANZA, J.M. Experimental acute pancreatitis. **Curr Opin Gastroenterol.**, v. 6, p. 763-768, 1990.

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

BRASIL. Ministério da saúde. **Secretaria Nacional de Vigilância sanitária**. Portaria SNVS n 19 de 30.01.92. Proíbe o uso de confrei (*Symphytum officinale* L.) em preparações para uso interno, 1992.

BRASIL, **Decreto nº. 5813**, de 22 de junho de 2006. Aprova a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília (DF).

BRUDGE W.R.; VAN DAN J. Pancreatic and biliary endoscopy. **N Engl J Med**, v. 341 (24), p. 1806-1816, 1999.

CALIXTO J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J.B.; SCHEIDT, C.; OTUKI, M.; SANTOS, A.R.S. Biological activity of plant extracts: novel analgesics drugs. *Expert Opin Emerg. Drugs*, v.6, p. 261-279, 2001.

CALIXTO, J.B.; CAMPOS, M.M.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Medica.**, v. 70, p. 93-103, 2004.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin América a Personal Reviw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

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.

CATERINA, M.J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, p. 487–517, 2001.

CECHINEL FILHO V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade, **Química Nova**, v. 21, p. 1, 1998.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para ativação da atividade. **Quim. Nova**, v.21, n.1, p.99, 1998.

CEVIKEL, M.H.; OZGÜN, H.; BOYLU, S.; DEMIRKIRAN, A.E.; SAKARYA, S.; CULHACI, N. Nitric oxide regulates bacterial translocation in experimental acute edematous pancreatitis. **Pancreatology**, v. 3, p. 329-335, 2003.

CHAKRABORTI, S. ; MICHAEL, J.R. ; CHAKRABORTI, T. Role of an aprotinin-sensitive protease in protein kinase Calpha-mediated activation of cytosolic phospholipase A2 by calcium ionophore (A23187) in pulmonary endothelium. **Cell Signal.**, v.16(6), p. 751-762, 2004.

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

CHEN, X.; JI, B.; HAN, B.; ERNST, S.; SIMEONE, D.; LOGSDON, C. NF- κ B activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response. **Gastroenterology**, v. 122, p. 448-457, 2002.

CLOUATRE, D. L. Kava kava: examining new reports of toxicity. **Toxicology Letters**. v.150 (1), p.85-96, 2004.

CONNOR, S.; NEOPTOLEMOS, J.P. Surgery for pancreatic necrosis: "whom, when and what". World J. **Gastroenterol.** v.10, p. 1697–1698, 2004.

CONOR J. SHIELDS, CONOR P. DELANEY, DESMOND C. WINTER, LEONIE YOUNG, THOMAS F. GOREY, and JOHN M. FITZPATRICK. Induction of Nitric Oxide Synthase is a Key Determinant of Progression to Pulmonary Injury in Experimental Pancreatitis. **SURGICAL INFECTIONS** Volume 7, Number 6, 2006

CORRÊIA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v.1, p. 82, 1984.

CROWFORD, J.; COTRAN, R.; PÂNCREAS. I.N.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, ROBBINS, T. *Patologia Estrutural e Funcional*. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan.**, p. 809-833, 2000.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; DUGO L.; SERRAINO I.; CENTORRINO, T.; CICCULO, A. Inducible nitric oxide synthase deficient mice exhibit resistance to the acute pancreatitis induced by cerulein. **Shock**, v. 17, p. 416–422, 2002.

CZAKO, L.; TAKACS, T.; VARGA, I.S.; HAI, D.Q.; TISZLAVICZ, L.; HEGYI, P.; MANDI, Y.; MATKOVICS, B.; LONOVICS, J. The pathogenesis of L-arginine-induced acute necrotizing pancreatitis: inflammatory mediators and endogenous cholecystokinin. **J Physiol Paris.**, v. 94, p. 43-50, 2000.

DABROWSKI, A.; GABRYELEWICZ, A.; WERESZCZYNSKA-SIEMIATKOWSKA, U.; CHYCZEWSKI, L. Oxygen-derived free radicals in cerulein-induced acute pancreatitis. **Scand J Gastroenterol.**, v 23,p. 1245-1249, 1988.

DABROWSKI, A.; GABRYELEWICZ, A. Nitric oxide contributes to multiorgan oxidative stress in acute experimental pancreatitis. **Scand J Gastroenterol**, v. 29, p. 943-948, 1994.

DABROWSKI, A.; KONTUREK, S.J.; KONTUREK, J.W.; GABRYELEWICZ, A. Role of oxidative stress in the pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis. **Eur J Pharmacol.**, v. 377, p. 1-11, 1999.

DAS, D.; MUKHERJEE, S.; DAS, A.S.; MUKHERJEE, M.; MITRA, C. Aqueous extract of black tea (*Camellia sinensis*) prevents ethanol+cholecystokinin-induced pancreatitis in a rat model. 2005.

DAMIEN, A.; SHARMILA, A.; WEI NG, A.S.; BHATIA, M. Expression of Nitric Oxide Synthase Isoforms and Nitric Oxide Production in Acute Pancreatitis and Associated Lung Injury. **Pancreatology**, v. 9, p. 150-159, 2009.

DAWRA, R.; SHARIF, R.; PHILLIPS, P.; DUDEJA, V.; DHAULAKHANDI, D.; SALUJA, A.K. Development of a new mouse model of acute pancreatitis induced by administration of L-arginine. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 292, p. 1009–1018, 2007

DEMBINSKI, A.; WARZECHA, Z.; KONTUREK, S.J.; CERANOWICZ, P.; DEMBINSKI, M.; PAWLIK, W.W.; KUSNIERZ-CABALA B.; NASKALSKI, J.W. Extract of grapefruit-seed reduces acute pancreatitis induced by ischemia/reperfusion in rats: possible implication of tissue antioxidants. **J Physiol Pharmacol.**, v. 55(4), p. 811-821, 2004.

DEMBINSKI, A.; WARZECHA, Z.; CERANOWICZ, P.; WARZECHA, A.M. ; PAWLIK, W.W.; DEMBINSKI, M.; REMBIASZ, K. ; SENDUR, P. ; KUSNIERZ-CABALA, B.; TOMASZEWSKA, R.; CHOWANIEC, E.; KONTUREK, P.C. Dual, time-dependent deleterious and protective effect of anandamide on the course of cerulein-induced acute pancreatitis. Role of sensory nerves. **Eur J of Pharmacol.**, v. 591, p. 284-292, 2008.

DE SMET, P.A.G.M. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs**, v. 54, p. 801-840, 1997.

DIMAGNO E.P.; LAYER P.; CLAIN J.E. Chronic pancreatitis. The pancreas: biology, pathobiology and disease. **New York: Plenum Press**, p. 665-706, 1993.

DIMAGNO, M.J. Nitric oxide pathways and evidence- based perturbations in acute pancreatitis. **Pancreatology**, v. 7, p. 403–408, 2007.

DING, S.P.; LI, J.C.; JIN, C. A mouse model of severe acute pancreatitis induced with caerulein and lipopolysaccharide. **World J Gastroenterol.**, v. 9, p. 584-589, 2003.

DE BEAUX, A.C.; GOLDIE, A.S.; ROSS, J.A.; CARTER, D.C.; FEARON, K.C. Serum concentrations of inflammatory mediators related to organ failure in patients with acute pancreatitis. **Br J Surg**, v. 83, p. 349-353, 1996.

DHAULAKHANDI, D.; SALUJA, A.K. Development of a new mouse model of acute pancreatitis induced by administration of L-arginine, 2006.

DIMAGNO, M.J. Nitric oxide pathways and evidence-based perturbations in acute pancreatitis. **Pancreatology**, v. 7, p. 403–408, 2007.

Di STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar/Luiz Cláudio Di Stasi organizador. São Paulo: Editora UNESP, p. 10, 1996.

DUNN, J.A.; LI, C.; HA, T.; KAO, R.L.; BROWDER, W. Therapeutic modification of nuclear factor kappa B binding activity and tumor necrosis factor-alpha gene expression during acute biliary pancreatitis (in Chinese). **Am Surg.**, v. 63, p.1036–1044, 1997.

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.

EMMANUELLI, G. Experimental acute pancreatitis induced by platelet activating factor in rabbits. **Am J Pathol.**, v. 134, p. 315-326, 1989.

ESREFOGLU, M.; GUL, M.; ATES, B.; BATCIOGLU, K.; SELIMOGLU, M.A. Antioxidative effect of melatonin, ascorbic acid and N-acetylcysteine on caerulein-induced pancreatitis and associated liver injury in rats. **World J Gastroenterol.**, v. 12(2), p. 259-264, 2006.

ETEMAD, B.; WHITCOMB, D.C. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. **Gastroenterology**, v. 120, p. 682-7017, 2001.

ETHRIDGE, R.T.; HASHIMOTO, K.; CHUNG, D.H. Selective inhibition of NF-kappaB attenuates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. **J Am Coll Surg.**, v.195, p. 497–505, 2002.

EVANS, C.W. **Pharmacognosy**. UK: WB Saunders Company Limited, 1996.

FARBER, J.L.; KYLE, M.E.; COLEMAN, J.B. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Lab Invest**. v. 62, p. 670-679, 1990.

FOITZIK, T.; EIBL, G.; SCHNEIDER, P.; WENGER, F.A.; JACOBI, C.A.; BUHR, H.J. Omega-3 fatty acid supplementation increases anti-inflammatory cytokines and attenuates systemic disease sequelae in experimental pancreatitis. **J. Parenter. Enteral Nutr.**, v. 26, p. 351-356, 2002.

FOLCH-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.

FORMELA, L.J.; WOOD, L.M.; WHITTAKER, M.; KINGSNORTH, AN. Amelioration of experimental acute pancreatitis with a potent platelet-activating factor antagonist. **Br J Surg.**, v. 81, p. 1783-1785, 1994.

FORTSON, M.R.; FREEDMAN, S.N.; WEBSTER, P.D. Clinical assessment of hyperlipidemic pancreatitis. **Am J Gastroenterol.**, v. 90, p. 2134-2139, 1994.

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.

FREEMAN, B.A.; CRAPO, J.D. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, v. 47, p. 412-426, 1982.

FRIESS, H.; SHRIKHANDE, S.; RIESLE, E.; KASHIWAGI, M.; BACZAKO, K.; ZIMMERMANN, A.; UHL, W.; BUCHLER, M.W. Phospholipase A2 isoforms in acute pancreatitis. *Ann Surg*, v. 233(2), p. 204-12, 2001.

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

FUJII, Y.; TAKEUCHI, H.; TANAKA, K.; SAKUMA, S.; OHKUBO, Y.; MUTHO, S. Effects of FK-506 (Tacrolimus Hydrate) on chronic oxazolone induced dermatitis in rats. *Eur J Pharmacol*, v. 456, p. 115-121, 2002.

GALLOWAY, S.W.; KINGSNORTH, A.N. Lung injury in the microembolic model of acute pancreatitis and amelioration by lexipafant (BB-882), a platelet-activating factor antagonist. *Pancreas*, v. 13, p. 140-146, 1996.

GENOVESE, T.; MAZZON, E.; DI PAOLA, R.; MUIÀ, C.; CRISAFULLI, C.; MALLEO, G.; ESPOSITO, E.; CUZZOCREA, S. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in acute pancreatitis induced by cerulein. *Immunology*, v. 118, p. 559-570, 2006a.

GENOVESE, T.; MAZZON, E.; DI PAOLA, R.; MUIÀ, C.; CRISAFULLI, C.; MENEGAZZI, M.; MALLEO, G.; SUZUKI, H.; CUZZOCREA, S. Hypericum perforatum attenuates the development of cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **Shock.**, v. 25(2), p. 161-167, 2006b.

GODINHO, R. Etiopatogenia da Pancreatite Aguda. **Revista de Gastreterologia & Cirurgia.** v. 14, p. 155-71, 1997.

GOMEZ-CAMBRONERO, L.; CAMPS, B.; DELA ASUNCION, J.G.; CERDA, M.; PELLIN, A.; PALLARDO, F.V.; CALVETE, J.; SWEIRY, J.H.; MANN, G.E.; VINA, J.; SASTRE, J. Pentoxifylline ameliorates caeruleine-induced pancreatitis in rats: role of glutathione and nitric oxide. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 293, p. 670-676, 2000.

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

GORELICK, F.S.; OTANI, T. Mechanisms of intracellular zymogen activation. **Baillière's Clin Gastroenterol.**, v. 13, p. 227–240, 1999.

GOUGH, D.B.; BOYLE, B.; JOYCE, W.P.; DELANEY, C.P.; McGEENEY, K.F. Free radicals inhibition and serial chemiluminescence in evolving experimental pancreatitis. **Br J Surg**, v. 77, p. 1256-1259, 1990.

GRADY, E.F.; YOSHIMI, S.K.; MAA, J.; VALEROSO, D.; VARTANIAN, R.K.; RAHIM, S.; KIM, E.H.; GERARD, C.; GERARD, N.; BUNNETT, N.W.; KIRKWOOD, K.S. Substance P mediates inflammatory oedema in acute pancreatitis via activation of the neurokinin-1 receptor in rats and mice. **Br J Pharmacol.**, v. 130, p. 505–512, 2000.

GRANGER, J.; REMICK, D. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators. **Shock**, v. 24, p. 45-51, 2005.

GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in germfree and conventional rat. **Science**, v. 212 (4490), p. 56-58, 1981.

GRISHAM, M.B.; JOURD'HEUIL, D.; WINK, D.A. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. **Am J Physiol**, v. 276, p. 315–321, 1999.

GROSS, V.; ANDREESEN, R.; LESER, H.G.; CESKA, M.; LIEHL, E.; LAUSEN, M.; FARTHMAN, E.H.; SCHÖLMERICH, J. Interleukin-8 and neutrophil activation in acute pancreatitis. **Eur J of Clinical Invest**, v. 22(3), p. 200-203, 1992.

GUKOVSKAYA, A.S.; PERKINS, P.; ZANINOVIC, V.; SANDOVAL, D.; RUTHERFORD, R.; FITZSIMMONS, T.; PANDOL, S.J.; POUCELL-HATTON, S. Mechanisms of cell death after pancreatic duct obstruction in the opossum and the rat. **Gastroenterology**, v. 110, p. 875–884, 1996.

GUKOVSKAYA, A.S.; GUKOVSKY, I.; ZANINOVIC, V.; SONG, M.; SANDOVAL, D.; GUKOVSKY, S.; PANDOL, S.J. Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis. **J. Clin. Invest**, v. 100, p. 1853-1862, 1997.

GUKOVSKAYA, A.S.; HOSSEINI, S.; SATOH, A.; CHENG, J.H.; NAM, K.J.; GUKOVSKY, I.; PANDOL, S.J. Ethanol differentially regulates NF-kappaB activation in pancreatic acinar cells through calcium and protein kinase C pathways. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 286(2), p. 204-213, 2004a.

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

GUMASTE, V.V.; RODITIS, N.; MEHTA, D. Serum lipase levels in nonpancreatic abdominal pain versus acute pancreatitis. **Am J Gastroenterol.**, v. 88, p. 2051-2055, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.; Role of iron oxygen radical reactions. **Methods Enzymol., New York**, v. 105, p. 47, 1984.

HAMBURGER, M., HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine, v. 30, p. 3864-3874, 1991.

HASHIMOTO, E.; YAMAMURA, H. Further studies on the ionic strength-dependent proteolytic activation of protein kinase C in rat liver plasma membrane by endogenous trypsin-like protease. **J Biochem** (Tokyo). v. 106(6), p. 1041-1048, 1989.

HAN, B.; LOGSDON, C.D. CCK stimulates mob-1 expression and NF-kappaB activation via protein kinase C and intracellular Ca(2+). **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 278(2), p. 344-351, 2000.

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.

HEGYI, P.; RAKONCZAYZ, J.R.; SARI, R.; GOG, C.; LONOVICS, J.; TAKACS, T.; CZAKO, L. L-arginine-induced experimental pancreatitis. **World J Gastroenterol.**, v. 10, p. 2003-2009, 2004.

HERNANDEZ-PEREZ, M.; SANCHEZ-MATEO, C.C.; MONTALBETTI-MORENO, Y.; RABANAL, R.M. Studies on the analgesic and anti-inflammatory effects of *Sideritis candicans* Ait. var. *eriocephala* Webb aerial part. **J Ethnopharmacol.**, v.93, p. 279-84, 2004.

HINES, O. J.; REBER, H. A. Pancreatic surgery. **Current Opinion in Gastroenterology**. v. 25(5), p. 460, 2009.

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.

HOFBAUER, B.; SALUJA, A.K.; BHATIA, M.; FROSSARD, J.L.; LEE, H.S.; BHAGAT, L.; STEER, M.L. Effect of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase on two models of experimental acute pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 115, p. 1238–1247, 1998.

HOLANDA PINTO, S.A.; PINTO, L.M.; GUEDES, M.A.; CUNHA, G.M.; CHAVES, M.H.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Antinoceptive effect of triterpenoid alpha,beta-amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. **Phytomedicine.**, v. 15(8), p. 630-634, 2008a.

HOLANDA PINTO, S.A.; PINTO, L.M.; CUNHA, G.M.; CHAVES, M.H.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Anti-inflammatory effect of alpha, beta-Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. **Inflammopharmacology.**, v.16(1), p. 48-52, 2008b.

HOTTER, G.; CLOSA, D.; PRATS, N.; PI, F.; GELPI, E.; ROSELLO-CATAFAU, J. Free radical enhancement promotes leucocyte recruitment through a PAF and LTB4 dependent mechanisms. **Free Radical Biol Med**. v. 22, p. 947-954, 1997.

HRUBAN, R.H.; ADSAY, N.V. Molecular classification of neoplasms of the pancreas. **Hum Pathol.**, v. 40 (5), p. 612-623, 2009.

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.

ISHIBASHI, T.; ZHAO, H.; KAWABE, K.; OONO, T.; EGASHIRA, K.; SUZUKI, K.; NAWATA, H.; TAKAYANAGI, R.; ITO, T. Blocking of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) activity attenuates the severity of acute pancreatitis in rats. **J of Gastroenterol.**,v. 43, p. 79-85, 2008.

JAMBRIK, Z.; GYONGYOGL, M.; HEGY, P.; CZAKÓ, L.; TAKÁES, T.; FARKAS, A.; MANDY, Y.; GÓG, C.; GLOGAR, D.; CSANÁDY, M. Plasma levels of IL-6 correlate with hemodynamic abnormalities in acute pancreatitis in rabbits. **Intensive Care Medicine**, v. 28(12), p. 1810-1818, 2002.

JAWOREK, J.; LEJA-SZPAK, A.; BONIOR, J.; NAWROT, K.; TOMASZEWSKA, R.; STACHURA, J.; SENDUR, R.; PAWLIK, W.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S.J. Protective effect of melatonin and its precursor L-tryptophan on acute pancreatitis induced by caerulein overstimulation or ischemia/reperfusion. **J Pineal Res.**, v. 34, p. 40-52, 2003

JEDINAK, A.; MUCKOVA, M.; KOST'ALOVA, D.; MALIAR, T.; MASTEROVA, I. Antiprotease and antimetastatic activity of ursolic acid isolated from *Salvia officinalis*. **Z Naturforsch [C]**, v. 61(11-12), p. 777-782, 2006.

JOHNSON, C.D.; KINGSNORTH, A.N.; IMRIE, C.W.; MC-MAHON, M.J.; NEOPTOLEMOS, J.P.; MCKAY, C.; TOH, S.K.; SKAIFE, P.; LEEDER, P.C.; WILSON, P.; LARVIN, M.; CURTIS, L.D. Double blind, randomised, placebo controlled study of a platelet activating factor antagonist, lexipafant, in the treatment and prevention of organ failure in predicted severe acute pancreatitis. **Gut**, v. 48, p. 62-69, 2001.

JUNG, W.S.; CHAE, Y.S.; KIM, D.Y.; SEO, S.W.; PARK, H.J.; BAE, G.S.; KIM, T.H.; OH, H.J.; YUN, K.J.; PARK, R.K.; KIM, J.S.; KIM, E.C.; HWANG, S.Y.; PARK, B.K.; CHUNG, J.B.; LEE, J.H.; SUH, J.H.; PARK, S.W.; SONG, S.Y.; KIM, H.; KIM, K.H.; KANG, J.K. Role of oxygen free radicals in patients with acute pancreatitis. **World J Gastroenterol**, v. 9, p. 2266-2269, 2003.

JUNG, W.S.; CHAE, Y.S.; KIM, D.Y.; SEO, S.W.; PARK, H.J.; BAE, G.S.; KIM, T.H.; OH, H.J.; YUN, K.J.; PARK, R.K.; KIM, J.S.; KIM, E.C.; HWANG, S.Y.; PARK, S.J.; SONG, H.J. Gardenia jasminoides protects against cerulein-induced acute pancreatitis. **World J Gastroenterol**. v. 14(40), p. 6188-6194, 2008.

KAISER, A.M.; SALUJA, A.K.; SENGUPTA, A.; SALUJA, M.; STEER, M.L. Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. 1295–1304, 1995.

KANDIL, E.; LIN, Y.; BLUTH, M.H.; ZHANG, H.; LEVI, G.; ZENILMAN, M.E. Dexamethasone mediates protection against acute pancreatitis via upregulation of pancreatitis-associated proteins. **World J Gastroenterol**, v. 12(42), p. 6806-6811, 2006.

KELLY, T.R. Gallstone pancreatitis. **Pathophysiology**, v. 80, p. 488-492, 1976.

KIM, H.; SEO, J.Y.; KIM, K.H. NF-kappaB and cytokines in pancreatic acinar cells. **J. Korean Med. Sci.**, v. 15, p. 53-54, 2000.

KINGHORN, A.D.J. Pharmacognosy in the 21st century. **Pharm. Pharmacol.**, v. 53, p. 135-148, 2001.

KINGSNORTH, A.N.; GALLOWAY, S.W.; FORMELA, L.J. Randomized double-blind phase II trial of lexicapant, a platelet factor antagonist, in human acute pancreatitis. **Br J Surg.**, v. 82, p. 1414-1420, 1995.

KOLAR, J.C.; ELLIS, C.J.; HEVITT, M.D. Comparison of serum amylase pancreatic isoamylase and lipase in patients with hyperamylasemia. **Dig Dis Sci.**, v. 29, p. 289-293, 1984.

KONTUREK, S.J.; DEMBINSKI, A.; KONTUREK, P.J.; WARZECHA, Z.; JAWOREK, J.; USTAW P. Role of platelet activating factor in pathogenesis of acute pancreatitis in rats. **Gut**, v. 33, p. 1268– 1274, 1992.

KRAWISZ J.E.; SHARON P.; STENSON W.F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation base don myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology**, v. 87 (6), p. 1344-1350, 1984.

KUNDAKOVIC, T.; FOKIALAKIS, N.; MAGIATIS, P.; KOVACEVIC, N.; CHINOU, I. Triterpenic derivatives of *Achillea alexandri-regis*. **Chem Pharm Bull**, v. 52, p. 1462-14655, 2004.

KWEIFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.A. Antilipoxygenase activity of amyirin triterpenes. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, v. 78, p. 367-72, 1992.

LAZAR, G.J.R.; DUDA, E.; LAZAR, G. Effect of RU-38486 on TNF production and toxicity. **FEBS Lett.** v. 308, p. 137-140, 1992.

LAWINSKI, M.; SLEDZINSKI, Z.; KUBASIK-JURANIEC, J.; SPODNIK, J.H.; WOZNIAK, M.; BOGUSLAWSKI, W. Does resveratrol prevent free radical-induced acute pancreatitis?. **Pancreas**. v. 31(1), p. 43-47, 2005.

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.

LI, L.; BHATIA, M.; MOORE, K. Hydrogen sulphide-a novel mediator of inflammation?. **Curr Opin Pharmacol.**, v. 6, p. 125-129, 2006.

LI, Y.Y.; SIBAEV, A.; ZHOU, M.Z.; ZHU, G.Y.; YÜCE, B.; STORR, M. The Chinese herbal preparation Qing Yi Tang (QYT) improves intestinal myoelectrical activity and increases intestinal transit during acute pancreatitis in rodents. **Phytother Res.**, v. 21, p. 324-331, 2007.

LIDDLE, R.A. The role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) channels in pancreatitis. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1772, p. 869-878, 2007.

LIMA, V. **Evidências da participação de TNF- α e COX-2 nas mucosites oral e intestinal induzidas por 5-fluorouracil e metotrexato em animais.** 2004. 197 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade federal do Ceará. Fortaleza, 2004.

LIMA-JUNIOR, R.C.; OLIVEIRA, F.A.; GURGEL, L.A.; CAVALCANTE, I.J.; SANTOS, K.A.; CAMPOS, D.A.; VALE, C.A.; SILVA, R.M.; CHAVES, M.H.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Attenuation of visceral nociception by alpha- and beta-amyrin, a triterpenoid mixture isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*, in mice. **Planta Med.**, v. 72 (1), p. 34-39, 2006.

LIMA-JÚNIOR, R.C.; SOUSA, D.I.; BRITO, G.A.; CUNHA, G.M.; CHAVES, M.H.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene, alpha, beta-amyrin in a mouse model of cystitis: role of tachykinin NK(1)-receptors, and K(+)(ATP) channels. **Inflamm Res.**, v. 56(12), p. 487-494, 2007.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras. Manual de identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil.** 1a ed. São Paulo: Ed. Plantarum LTDA, 1992, p.76.

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.

MAA, J.; GRADY, E.F.; KIM, E.H.; YOSHIMI, S.K.; HUTTER, M.M.; BUNNETT, N.W.; KIRKWOOD, K.S. NK-1 receptor desensitization and neutral endopeptidase terminate SP-induced pancreatic plasma extravasation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 279, p. 726–732, 2000.

MAIA, R.M.; BARBOSA, P.R.; CRUZ, F.G.; ROQUE, N.F.; FASCIO, M. Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae): caracterizção em misturas binárias. **Quim. Nova**, v. 23, p. 623-625, 2000.

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.

MAO, W.; XI, L.G.; WANG, X.G. Effect of Gardenia Jasminoides Ellis extract on myeloperoxidase in severe acute pancreatitis. **J Hepatopancreatobiliary Surg**, v. 15, p. 156-157, 2003.

MAO, W.; JIA, Y.J.; JIANG, M.N. Effect of Gardenia Jasminoides Ellis Extract on TNF- α and IL-6 in severe acute pancreatitis. **Chin J Surg Integr Tradit West Med**, v. 9, p. 448-450, 2003.

MCKAY, C.J. Recent developments in the management of acute pancreatitis. **Dig Surg**, v. 19, p. 129-134, 2002.

MAKHIJA, R.; KINGSNORTH, A.N. Cytokine storm in acute pancreatitis. **J Hepatobiliary Pancreat Surg.**, v. 9, p. 401–410, 2002.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, v. 78, p. 927-930, 1994.

MALLEO, G.; MAZZON, E.; GENOVESE, T.; DI PAOLA, R.; MUIÁ, C.; CRISAFULLI, C.; SIRIWARDENA, A.K.; CUZZOCREA, S. Effects of thalidomide in a mouse modelo f cerulein-induced acute pancreatitis. **Shock**, v. 00, p. 00-00, 2007.

MARCINKIEWICZ, J.; GRABOWSKA, A.; CHAIN, B. Nitric oxide up-regulates the release of inflammatory mediators by mouse macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, p. 947-951, 1995.

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(6), p. 3370-3381, 2006.

MASHIMO, H.; GOYAL, R.K. Lessons from genetically engineered animal models. IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice. **Am J Physiol.**, v. 277, p. 745–750, 1999.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais: guia de seleção e aproveitamento de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil.** Fortaleza: IOCE, 1989.

MAYER, A.D.; Mc MAHON, M.J.; BOWEN, M.; COOPER, E.H. C-reactive protein: an aid to assessment and monitoring of acute pancreatitis. **J Clin Pathol.**, v. 37, p. 207-211, 1984.

MEDEIROS, R.; OTUKI, M.F.; AVELLAR, M.C.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene alpha-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Eur J Pharmacol.**, v. 559(2-3), p. 227-235, 2007.

MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; SHENKEL, E.P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira Farmacognosia.** v. 11, p. 21-35, 2001.

MENGER, M.D.; PLUSCZYK, T.; VOLLMAR, B. Microcirculatory derangements in acute pancreatitis. **J Hepatobiliary Pancreat Surg.** v. 8, p. 187-194, 2001.

MERCURIO, F.; MANNING, A.M. NF-KAPPA B AS A PRIMARY REGULATOR OF THE STRESS RESPONSE. **ONCOGENE**, v. 18, p. 6163–6171, 1999.

METTU, S.R.; WIG, J.D.; KHULLAR, M.; SINGH, G.; GUPTA, R. Efficacy of serum nitric oxide level estimation in assessing the severity of necrotizing pancreatitis. **Pancreatology**, v. 3, p. 506–514, 2003.

MIZUNUMA, T.; KAWAMURA, S.; KISHINO, Y. Effects of injecting excess arginine on rat pancreas. **J Nutr**, v. 114, p. 467–471, 1984.

MONCADA, S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Reviews**, v. 43(2), p. 109-142, 1991.

MORALES, O.H.; ROCHE, N.P.; SÁNCHEZ, R.M.F. Enzimas geradores de espécies reativas de oxígeno: mieloperoxidasa. **Rev Cubana Invest Biomed.**, v. 17 (3), p. 190-197, 1998.

MOREIRA, A.L.; SAMPAIO, E.P.; ZMUIDZINAS, A.; FRINDT, P.; SMITH, K.A.; KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. **J. Exp. Med.**, v. 177, p. 1675-1680, 1993.

MORETTO, L.D. **Pharm. Technol.**, v.4, p. 46, 2000.

MORRIS, S.M.; BILLIAR, T.R. New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis. **Am. J. Physiol.**, v. 266, p. 829-839, 1994.

MORSELLI-LABATE, A.M.; FANTINI, L.; PEZZILLI, R. Hydrogen sulfide, nitric oxide and a molecular mass 66 u substance in the exhaled breath of chronic pancreatitis patients. **Pancreatology**, v. 7, p. 497–504, 2007.

NARUSE, S. Molecular pathophysiology of pancreatitis. **Intern Med**, v. 42, p. 288–289, 2003.

NAVARRO MOLL, M. C. Uso racional de las plantas medicinales. **Pharmaceutical Care Espana.**, v. 2, p.9-19, 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, 1989.

NIEDERAU, C.; NIEDERAU, M.; LUTHEN, R.; STROHMEYER, G.; FERRELL, L.D.; GRENDALL, J.H. Pancreatic exocrine secretion in acute experimental pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 99, p. 1120-1127, 1990.

NONAKA, A.; MANABE, T.; KYOGOKU, T.; TAMURA, K.; TOBE, T. Changes in lipid peroxide and oxygen radical scavengers in cerulein-induced acute pancreatitis. Imbalance between the offense and defense systems. **Digestion**, v. 47, p. 130-137, 1990.

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

NORMAN, J.G.; FINK, G.W.; MESSINA, J.; CARTER, G.; FRANZ, M.G. Timing of tumor necrosis factor antagonism is critical in determining outcome in murine lethal acute pancreatitis. **Surgery**, v. 120, p. 515-521, 1996.

NORMAN, J.G.; FINK, G.W.; DENHAM, W.; YANG, J.; CARTER, G.; SEXTON, C.; FALKNER, J.; GOWER, W.R.; FRANZ, M.G. Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis. A probable mechanism for distant organ dysfunction. **Dig. Dis. Sci.**, v. 42, p. 1783-1788, 1997.

NORMAN, J.G. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. **Am J Surg.**, v. 175, p. 76-83, 1998.

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.

OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA-JUNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.; SANTOS, K.A.; MARTINS, F.S.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Gastroprotective effect of the mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **Planta Med.**, v. 70(8), p. 780-182, 2004a.

OLIVEIRA, F.A.; LIMA-JUNIOR, R.C.; CORDEIRO, W.M.; VIEIRA-JUNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Pentacyclic triterpenoids, alpha,beta-amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 78, p. 719-725, 2004b.

OLIVEIRA, F.A.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.; LIMA-JÚNIOR, R.C.; SILVA, R.M.; MAIA, J.L.; BRITO, G.A.; SANTOS, F.A.; RAO, VS. Protective effect of alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. **Ethnopharmacol.**, v. 98, p. 103-108, 2005.

OTUKI, M.F.; FERREIRA, J.; LIMA, F.V.; MEYRE-SILVA, C.; MALHEIROS, A.; MULLER, L.A.; CANI, G.S.; SANTOS, A.R.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 313(1), p. 310-318, 2005a.

OTUKI, M.F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **Eur J Pharmacol.**, v. 507(1-3), p. 253-259, 2005b.

PANDOL, S.J.; SALUJA, A.K.; IMRIE, C.W.; BANKS, P.A. Acute pancreatitis: Bench to the bedside. **Gastroenterology**, v. 132, p.1127-1151, 2007.

PAPACHRISTOU, G.I. 2008. Prediction of severe acute pancreatitis: Current knowledge and novel insights. **World J. Gastroenterol.**, v. 14, p. 6273-6275, 2008.

PARK, B.K.; CHUNG, J.B.; LEE, J.H.; SUH, J.H.; PARK, S.W.; SONG, S.Y.; KIM, H.; KIM, K.H.; KANG, J.K. Role of oxygen free radicals in patients with acute pancreatitis. **World J Gastroenterol.**, v. 9, p. 2266-2269, 2003.

PARK, S.J.; SONG, H.J. Gardenia jasminoides protects against cerulein-induced acute pancreatitis. **World J. Gastroenterol.**, v. 14, p. 6188-6194, 2008.

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

PASZT, A.; TAKACS, T.; RAKONCZAY, Z. The role of the glucocorticoid-dependent mechanism in the progression of sodium taurocholate-induced acute pancreatitis in the rat. **Pancreas**. v. 29, p. 75-82, 2004.

PEREDA, J.; SABATER, L.; APARISI, L.; ESCOBAR, J.; SANDOVAL, J.; VIÑA, J.; LÓPEZ-RODAS, G.; SASTRE, J. Interaction between cytokines and oxidative stress in acute pancreatitis. **Curr Med Chem.**, v. 13(23), p. 2775-87, 2006.

PEZZILLI, R.; CECILIATO, R.; BARAKAT, B.; CORINALDESI, R. Immune manipulation of the inflammatory response in acute pancreatitis. What can be expected? **J Pancreas**, v. 5, p. 115–121, 2004.

PEZZILLI, R; BILLI, P; MINIERO, R; FIOCCHI, M; CAPPELLETI, O; MORSELLI-LABATE, AM; BARAKAT, B; SPROVIERI, G; MIGLIOLI, M. Serum interleukin-6, interleukin-8, and 2-microglobulin in early assessment of severity of acute pancreatitis. Comparison with serum C-reactive protein. **Dig Dis Sci**, v. 40, p. 2341-2348, 1995.

POCH, B.; GANSAUGE, F.; RAU, B. The role of polymorfonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in experimental acute pancreatitis: mediators of local destruction and activators of inflammation. **FESB Lett**, v. 461, p 268-272, 1999.

POORAN, N.; INDARAM, A.; SINGH, P.; BANK, S. Cytokines (IL-6, IL-8 e TNF): early and reliable predictors of severe acute pancreatitis. **J Clin Gastroenterol.**, v. 37, p. 263-266, 2003.

QI, W.; TAN, D.X.; REITER, R.J.; KIM, S.J.; MANCHESTER, L.C.; CABRERA, J.; SAINZ, R.M.; MAYO, J.C. Melatonin reduces lipid peroxidation and tissue edema in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. **Dig Dis Sci.**, v. 44, p. 2257-2262, 1999.

QUEIROZ, M.S. O paradigma mecanista da medicina ocidental moderna: uma perspectiva antropológica. **Revista de Saúde Pública**, v. 20, p. 309-317, 1986.

RAJIC, A.; AKIHISA, T.; UKIYA, M.; YASUKAWA, K.; SANDEMAN, R.M.; CHANDLER, D.S.; POLYA, G.M. Inhibition of trypsin and chymotrypsin by anti-inflammatory triterpenoids from Compositae flowers. **Planta Med.**, v. 67, p. 599-604, 2001.

RAKONCZAY, Z.; JARMAYK, J.R.; KASZAKI, J.; MANDI, Y.; DUDA, E.; HEGYI, P.; BOROS, I.; LONOVICS, J.; TAKACS, T. NF-kappaB activation is detrimental in arginine-induced acute pancreatitis. **Free Radic Biol Med.**, v. 34, p. 696-709, 2003.

RAKONCZAY, Z.J.R.; HEGYI, P.; TAKACS, T.; MCCARROLL, J.; SALUJA, A. The Role of NF- κ B Activation in the Pathogenesis of Acute Pancreatitis. **Gut.**, v. 57, p. 259-267, 2008.

RANSON, J.H.C.; BALTHAZAR, E.J.; CACCAVALE, R.; COOPER, M. Computed tomography and the prediction of pancreatic abscess in acute pancreatitis. **Ann Surg.**, v. 201, p. 656-663, 1985.

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

RARATY, M.G.; CONNOR, S.; CRIDDLE, D.N.; SUTTON, R.; NEOPTOLEMOS, J.P. Acute pancreatitis and organ failure: pathophysiology, natural history, and management strategies. **Curr. Gastroenterol.**, v. 6, p. 99–103, 2004.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon.**, v.39, p.603-13, 2001.

RAU, B.; POCH, B.; GANSAUGE, F.; BAUER, A.; NÜSSLER, A.K.; NEVALAINEN, T.; SCHOENBERG, M.H.; BEGER, H.G. Pathophysiologic role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage?. **Ann. Surg.**, v. 231, p. 352-360, 2000.

RAU, B.; BAUMGART, K.; KRÜGER, C.M.; SCHILLING, M.; BEGER, H.G. CC-chemokine activation in acute pancreatitis: enhanced release of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with local and systemic complications. **Intensive Care Med.**, v. 29(4), p. 622-629, 2003.

REGNÉR, S.; MANJER, J.; APPELROS, S.; HJALMARSSON, C.; SADIC, J.; BORGSTRÖM, A. Protease activation, pancreatic leakage, and inflammation in acute pancreatitis: differences between mild and severe cases and changes over the first three days. **Pancreatology.**, v. 8(6), p. 600-607, 2008.

RINDERKNECHT, H. Fatal pancreatitis, a consequence of excessive leukocyte stimulation? **Int J Pancreatol.**, v. 3, p. 105–112, 1988.

RIVERA, J.A.; WERNER, J.; WARSHAW, A.L.; LEWANDROWSKI, K.B.; RATTNER, D.W.; FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C. Lexipafant fails to improve survival in severe necrotizing pancreatitis in rats. **Int J Pancreatol.**, v. 23, p. 101–106, 1993.

RUIPING, Z.; XIPING, Z.; JIE, Z.; JUNSHENG, W.U.; QIAN, Y.; RUJUN, X.; JING, Y.; XIN, F.; LU, J.; JIA, H.; WENQIN, Y. Efficacy and Mechanism of Salvia Miltiorrhizae Injection in the Treatment of Rats with Severe Acute Pancreatitis. **Inflammation.** v. 32 (2), p. 109-119, 2009.

SALUJA, A.; SAITO, I.; SALUJA, M.; HOULIHAN, M.J.; POWERS, R.E.; MELDOLESI, J.; STEER, M. In vivo rat pancreatic acinar cell function during supramaximal stimulation with caerulein. **Am J Physiol.**, v. 249, p. 702-710, 1985.

SALUJA, A.; HOFBAUER, B.; YAMAGUCHI, Y.; YAMANAKA, K.; STEER, M. Induction of apoptosis reduces the severity of caerulein-induced pancreatitis in mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 220, p. 875–878, 1996.

SALUJA, A.K.; STERR, M.L.P. Pathophysiology of pancreatitis: role of cytokines and other mediators of inflammation. **Digestion**. v. 60 (1), p. 27, 1999.

SAMPAIO, E.P.; SARNO, E.N.; GALILLY, R.; COHN, Z.A.; KAPLAN, G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. **J. Exp. Med.**, v. 173, p. 699-703, 1991.

SANDOVAL, D.; GUKOVSKAYA, A.; REAVEY, P.; GUKOVSKY, S.; SISK, A.; BRAQUET, P.; PANDOL, S.J.; POUCELL-HATTON, S. The role of neutrophils and platelet-activating factor in mediating experimental pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 111, p. 1081–1091, 1996.

SANFEY, H.; BULKLEY, G.B.; CAMERON, J.L. The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis. **Ann Surg.**, v. 200, p. 405-413, 1984.

SANFEY, H.; BULKLEY, G.B.; CAMERON, J.L. The pathogenesis of acute pancreatitis. The source and role of oxygen-derived free radicals in three different experimental models. **Ann Surg.**, v. 201, p. 633-639, 1985.

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.

SATOH, A.; SHIMOSEGAWA, T.; FUJITA, M.; KIMURA, K.; MASAMUNE, A.; KOIZUMI, M.; TOYOTA, T. Inhibition of nuclear factor- κ B activation improves the survival of rats with taurocholate pancreatitis. **Gut**, v. 44, p. 253-258, 1999.

SCHEINMAN, R.I.; GUALBERT, A.; JEWELL, C.M. Characterization of mechanism involved in transrepression of NF- κ B by activated glucocorticoid receptors. **Mol Cell Biol.** v. 15, p. 943-953, 1995.

SCHMIDT, J.; RATTNER, D.W.; LEWANDROWSKI, K.; COMPTON, C.C.; MANDAVILLI, U.; KNOEFEL, W.T.; WARSHAW A.L. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. **Ann Surg.**, v. 215, p. 44-56, 1992.

SCHOENBERG, M.H.; BUCHLER, M.; SCHADLICH, H.; YONUES, M.; BULTMANN, B.; BEGER, H.G. Involvement of oxygen radicals and phospholipase A2 in acute pancreatitis of the rat. **Klin Wochenschr**, v. 67, p. 166-170, 1989.

SCHOENBERG, M.H.; BUCHLER, M.; BEGER, H.G. Oxygen radicals in experimental acute pancreatitis. **Hepatogastroenterology**, v. 41, p. 313-319, 1994.

SEO, S.W.; KOO, H.N.; AN, H.J.; KWON, K.B.; LIM, B.C.; SEO, E.A.; RYU, D.G.; MOON, G.; KIM, H.Y.; KIM, H.M.; HONG, S.H. Taraxacum officinale protects against cholecystokinin-induced acute pancreatitis in rats. **World J Gastroenterol.**, v. 11(4), p. 597-599, 2005.

SEO, S.W.; PARK, C.S.; HONG, S.H.; KWON, K.B.; MOON, H.C.; SONG, B.K.; KIM, K.Y.; PARK, Y.M.; SONG, H.J.; KIM, H.M.; PARK, S.J. Inhibitory effect of *Patrinia scabiosaefolia* on acute pancreatitis. **World J Gastroenterol.**, v. 12(7), p. 1110-1114, 2006.

SHI, C.; ZHAO, X.; WANG, X.; ZHAO, L.; ANDERSSON, R. Potential effects of PKC or protease inhibitors on acute pancreatitis-induced tissue injury in rats. **Vascul Pharmacol.**, v. 46(6), p. 406-411, 2007.

SHIELDS, C.J.; DELANEY, C.P.; WINTER, D.C.; YOUNG, L.; GOREY, T.F.; FITZPATRICK, J.M. Induction of Nitric Oxide Synthase is a Key Determinant of Progression to Pulmonary Injury in Experimental Pancreatitis. **Surgical Infections**, v. 7, 2006.

SHISHODIA, S.; MAJUMDAR, S.; BANERJEE, S.; AGGARWAL, B.B. Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of kappaBalpha kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. **Cancer Research**, v. 63, p. 4375-4383, 2003.

SHOKUHI, S.; BHATIA, M.; CHRISTMAS, S.; SUTTON, R.; NEOPTOLEMOS, J.P.; SLAVIN, J. Levels of the chemokines growth-related oncogene alpha and epithelial neutrophil-activating protein 78 are raised in patients with severe acute pancreatitis. **Br J Surg**, v. 89, p. 566-572, 2002.

SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.; MENEZES-DE-LIMA, O.J.R.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; FERNADEZ-FERREIRA, E.; SOARES, R.O.; ROSAS, E.C.; SUSUNAGA, G.S.; GUIMARÃES, A.C.; ZOGHBI, M.G.; HENRIQUES, M.G. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **J Ethnopharmacol.**, v. 66(1), p. 57-69. 1999.

SILVA, M.C.; CARVALHO, J.C.T. Plantas Mediciniais: In: CARVALHO J.C.T. Fitoterápicos. Antiinflamatórios. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP, **Tecmedd**, p. 480, 2004.

SINGH, L.; BAKSHI, D.K.; MAJUMDAR, S.; VASISHTA, R.K.; ARORA, S.K.; WIG, J.D. Expression of interferon-gamma-inducible protein-10 and its receptor CXCR3 in chronic pancreatitis. **Pancreatology**, v. 7(5-6), p. 479-90, 2007.

SLEISENGER, M.H.; FORDTRAN, J.S. Gastrointestinal Disease. **Pathophysiology, Diagnosis, Management**. - 6th ed. WB Saunders, Philadelphia, 1998.

SONG, A.M.; BHAGAT, L.; SINGH, V.P.; ACKER, G.G.D.V.; STEER, M.L.; SALUJA, A.K. Inhibition of cyclooxygenase-2 ameliorates the severity of pancreatitis and associated lung injury. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 283, p. 1166–1174, 2002.

SPIRO, H.M. **Clinical Gastroenterology**, 4th ed. McGraw-Hill, Inc., International Edition, 1993.

STEINBERG, W.M.; BARKIN, J.; BRADLEY, E.L.; DI MAGNO, E.; LAYER, P. Controversies en clinical pancreatology. **Pancreas**, v. 13, p. 219-225, 1996.

STEER, M.L.; SALUJA, A.K. Etiology and pathophysiology of acute pancreatitis in: go vlw, dimagno ep, gardner jd, lebenthal e, rebar ha, scheele ga, eds. **The Pancreas: Biology, Pathophysiology and Disease**. New York: Raven Press, p. 593-611, 1993.

STICKEL, F.; SEITZ, H. K. The efficacy and safety of comfrey. **Public Health Nutrition**. v.3(4), p. 501-508, 2000.

STICKEL, F.; BAUMULLER, H. M.; SEITZ, K.; VASILAKIS, D.; SEITZ, G.; SEITZ, H. K. Hepatitis induced by Kava (Piper methysticum rhizoma). **Journal of hepatology.**, v.39 (1), p.62-7, 2003.

SUSSUNAGA, G.S.; SIANI, A.C.; PIZZOLATTI, M.G.; YUNES, R.A.; DELLE MONACHE, F. Triterpenes from the resin of Protium heptaphyllum. **Fitoterapia**, v. 72, p. 709-711, 2001.

SUZUKI, S.; MIYASAKA, K.; JIMI, A.; FUNAKOSHI, A. Induction of Acute Pancreatitis by Cerulein in Human IL-6 Gene Transgenic Mice. **Pancreas**, v. 21 (1), p. 86-92, 2000.

SYROVETS, T.; BUCHELE, B.; KRAUSS, C.; LAUMONNIER, Y.; SYMMET, T. Acetil-boswellic acids inhibit lipopolysaccharide-mediated TNF- α induction in monocytes by direct interaction with kappaB kinases. **The Journal of Immunology.**, v. 174, p. 498-506, 2005.

SZABO, C: Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. **Toxicol Lett**, p. 105–112, 2003.

SZABOLCS, A.; REITER, R.J.; LETOHA, T.; HEGYI, P.; PAPAI, G.; VARGA, I.; JARMAY, K.; KASZAKI, J.; SARI, R.; LONOVICS, J.; TAKACS, T. Effect of melatonin on the severity of L-arginine-induced experimental acute pancreatitis in rats. **World J Gastroenterol.**, v. 812, p. 251-258, 2006a.

SZABOLCS, A.; VARGA, I.S.; VARGA, C.; BERKÓ, A.; KASZAKI, J.; LETOHA, T.; TISZLAVICZ, L.; SÁRI, R.; LONOVICS, J.; TAKÁCS, T. Beneficial effect of resveratrol on cholecystokinin-induced experimental pancreatitis. **Eur J Pharmacol.**, v. 532(1-2), p.187-193, 2006b.

SZMOLA, R.; KUKOR, Z.; SAHIN-TOTH, M. Human mesotrypsin is a unique digestive protease specialized for the degradation of trypsin inhibitors. **J Biol Chem.**, v. 278(49), p. 48580–48589, 2003.

TAKÁCS, T.; CZAKO, L.; JÁRMAY, K.; FARKAS, G.; MÁNDI, Y.; LONOVICS, J. Cytokine level changes in L-arginine-induced acute pancreatitis in rat. **Acta Physiol Hung**, v. 84, p. 147-156, 1996.

TAKACS, T.; CZAKO, L.; MORSCHL, E.; LASZLO, F.; TISZLAVICZ, L.; RAKONCZAY, Z.J.R.; LONOVICS, J. The role of nitric oxide in edema formation in L-arginine-induced acute pancreatitis. **Pancreas**, v. 25, p. 277–282, 2002.

TAMIZHSELVI, R.; MOORE, P.K.; BHATIA, M. Hydrogen sulfide acts as a mediator of inflammation in acute pancreatitis: in vitro studies using isolated mouse pancreatic acinar cells. **J Cell Mol Med.**, v. 11(2), p. 315-326, 2007.

TAMIZHSELVI, R.; MOORE, P.K.; BHATIA, M. Inhibition of hydrogen sulfide synthesis attenuates chemokine production and protects mice against acute pancreatitis and associated lung injury. **Pancreas.**, v. 36(4), p. 24-31, 2008.

TARPILA, E.; NYSTROM, P.O.; FRANZEN, L. Bacterial translocation during acute pancreatitis in rats. **Eur J Surg.** v. 159, p.109-113, 1993.

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.

THORAT, S.P.; REGE, N.N.; NAIK, A.S.; THATTE, U.M.; JOSHI, A.; PANICKER, K.N.; BAPAT, R.D.; DAHANUKAR, S.A. Emblica officinalis: a novel therapy for acute pancreatitis--an experimental study. **HPB Surg.**, v. 9(1), p. 25-30, 1995.

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

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

TSUKAHARA, Y.; HORITA, Y.; ANAN, K.; MORISAKI, T.; TANAKA, M.; TORISU, M. Role of nitric oxide derived from alveolar macrophages in the early phase of acute pancreatitis. **J Surg Res.**, v. 66, p. 43–50, 1996.

UHL, W.; WARSHAW, A.; IMRIE, C.; BASSI, C.; MCKAY, C.J.; LANKISCH, P.G.; CARTER, R.; DI MAGNO, E.; BANKS, P.A.; WHITCOMB, D.C.; DERVENIS, C.; ULRICH, C.D.; SATAKE, K.; GHANEH, P.; HARTWIG, W.; WERNER, J.; MCENTEE, G.; NEOPTOLEMOS, J.P.; BUCHLER, M.W. International Association of Pancreatology: IAP Guidelines for the Surgical Management of Acute Pancreatitis. **Pancreatology**, v. 2, p. 565–573, 2002.

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.

URUNUELA, A.; SEVILLANO, S.; DE LA MANO, A.M.; MANSO, M.A.; ORFAO, A.; DE DIOS, I. Time-course of oxygen free radical production in acinar cells during acute pancreatitis induced by pancreatic duct obstruction. **Biochim Biophys Acta**, v. 1588, p. 159-164, 2002

VALE, A.E.; DAVID, J.M.; BRANDAO, H.N.; DAVID, J.P. A new flavonol glycoside derivative from leaves of *Moldenhawera nutans*. **Z Naturforsch**, v. 60, p. 45-49, 2005.

VALLETTE, G.; JARRY, A.; LEMARRE, P.; BRANKA, J.E.; LABOISSE, C.L. NO-dependent and NO-independent IL-1 production by a human colonic epithelial cell line under inflammatory stress. **Br. J. Pharmacol.**, v. 121, p.187-192, 1997.

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

VARGA, I.S.; MATKOVICS, B.; CZAKÓ, L.; HAI, D.Q.; KOTORMAN, M.; TAKACS, T.; SASVARI, M. Oxidative stress changes in L-arginine-induced pancreatitis in rats. **Pancreas**, v. 14, p. 355-359, 1997.

VARGA, I.S.; MATKOVICS, B.; HAI, D.Q.; KOTORMAN, M.; TAKACS, T.; SASVARI, M. Lipid peroxidation and antioxidant system changes in acute L-arginine pancreatitis in rats. **Acta Physiol Hung.**, v. 85, p.129-138,1997.

VEGE, S.; CHARI, S.T. **Pathogenesis of acute pancreatitis**. Uptodate Online; (2007). Available at: http://www.utdol.com/utd/content/topic.do?topicKey¼pancdis/4682 &selectedTitle¼5w114&source¼search_result.

VELJACA, M.; LESCH, C.A.; PLLANA, R.; SANCHEZ, B.; CHAN, K.; GUGLIETTA, A. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 272 (1), p. 417-422, 1995.

VILLASENOR, I.M.; CANLAS, A.P.; FAUSTINO, K.M.; PLANA, K.G. Evaluation of the bioactivity of triterpene mixture isolated from *Carmona retusa* (Vahl.) Masam leaves. **J Ethnopharmacol.**, v. 92, p. 53-6, 2004.

VIEIRA-JÚNIOR, G.M.; SOUZA, C.M.L.; CHAVES, M.H. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. **Quim. Nova**, v. 28, p. 183-187, 2005.

VITOR, C.E.; BALZ, D.; FIGUEREDO, C.P.; MAZZUCO, T.L.; CALIXTO, J.B. alpha,beta-amyrin reverses tnbs-induced colitis in mice by reducing vegf expression and abolishing nf-kb activation. **Encontro Nacional em Produtos Naturais e Toxinologia**, Riberao Preto, São Paulo. Abstract 09.007, 2008.

VITOR, C.E.; FIGUEIREDO, C.P.; HARA, D.B.; BENTO, A.F.; MAZZUCO, T.L.; CALIXTO J. B. Therapeutic action and underlying mechanisms of a combination of two pentacyclic triterpenes, alpha- and beta-amyrin, in a mouse model of colitis. **Br J Pharmacol.** v. 157 (6), p. 1034-1044, 2009.

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.

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

WATANABE, O.; BACCINO, F.M.; STEER, M.L. MELDOLESI, J. Supramaximal caerulein stimulation and ultrastructure of rat pancreatic acinar cell: early morphological changes during development of experimental pancreatitis. **Am J Physiol.**, v. 246, p. 457-467, 1984.

WERNER, J.; HARTWIG, W.; SCHMIDT, E.; GEBHARD, M.M.; HERFARTH, C.; KLAR, E. Reduction of local and systemic complications of acute pancreatitis by monoclonal antibody to ICAM-1. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* v. 115, p. 725-729, 1998.

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.

WHITTON, P. A.; LAU, A.; SALISBURY, A.; WHITEHOUSE, J.; EVANS, C. S. Kava lactones and the kava-kava controversy. **Phytochemistry**. v. 64 (3), p. 673-679, 2003.

WICK, E.C.; HOGE, S.G.; GRAHN, S.W.; KIM, E., DIVINO, L.A., GRADE, E.F.; BUNNETT, N.W.; KIRWOOD, K.S. Transient receptor potential vanilloid 1, calcitonin gene-related peptide, and substance P mediate nociception in acute pancreatitis. **Am. J. Physical Gastrointest Liver Physiol.** v. 290 (5), p. 959-969, 2006.

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 β signalling aborts caerulein induced pancreatitis and eliminates restricted stimulation at high caerulein concentrations. **Gut**, v. 56, p. 685-692, 2007.

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

WISNER, J.; GREEN, D.; FERRELL, L.; RENNER, I. Evidence for a role of oxygen derived free radicals in the pathogenesis of caerulein induced acute pancreatitis in rats. **Gut**, v. 29, p. 1516-1523, 1998.

WHITEMAN, M.; ARMSTRONG, J.S.; CHU, S.H.; SIAU, J.L.; WONG, B.S.; CHEUNG, N.S.; HALLIWELL, B.; MOORE, P.K. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite scavenger? **J. Neurochem**, v. 90, p. 765-768, 2004.

WU, G.; MORRIS, S.M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochem J**, v. 336, p. 1-17, 1998.

XI-PING ZHANG, ZHI-JUN LI, JIE ZHANG. Inflammatory mediators and microcirculatory disturbance in acute pancreatitis. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int.** v. 8, p. 351-357, 2009.

XU, C.F.; WU, A.R.; SHEN, Y.Z. Effects of N-acetylcysteine on mRNA expression of monocyte chemotactic protein and macrophage inflammatory protein 2 in acute necrotizing pancreatitis: experiment with rats *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.*, v. 88(10), p. 711-715, 2008.

YASUI, K.; KOBAYASHI, N.; YAMAZAKI, T.; AGEMATSU, K. Thalidomide as an immunotherapeutic agent: the effects on neutrophil-mediated inflammation. **Curr. Pharm. Des.**, v. 11, p. 395-401, 2005.

YOKOMURA, I.; IWASAKI, Y.; NAGATA, K.; NAKANISHI, M.; NATSUHARA, A.; HARADA, H. Role of intercellular adhesion molecule 1 in acute lung injury induced by candidemia. **Exp Lung Res.**, v. 27, p. 417-431, 2007.

ZEYBEK, N.; GORGULU, S.; YAGCI, G.; SERDAR, M.; SIMSEK, A.; KAYMAKCIOGLU, N.; DEVECI, S.; OZCELIK, H.; TUFAN, T. The effects of ginkgo biloba extract (EGb 761) on experimental acute pancreatitis. **J Surg Res.**, v. 115(2), p. 286-293, 2003.

ZHANG, T.; SU, Z. Changes of blood IL-6, TNF-alpha and effects of rheum in rats with acute pancreatitis. **Chin J Surg Integr Tradit West Med.**, v. 11, p. 143-145, 2005.

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.

ZHANG, X.; WU D.; JIANG, X. Icam-1 and acute pancreatitis complicated by acute lung injury. **JOP.**, v. 10(1), p. 8-14, 2009.

ZHANG, X.P.; LI, Z.J.; ZHANG, J. Inflammatory mediators and microcirculatory disturbance in acute pancreatitis. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int.** v. 8 (4), p. 351-357, 2009.

ZHAO, K.Q.; LIU, X.H. Multitarget therapeutical effect of rhubarb on acute pancreatitis. **Chin J Gastroenterol.**, v. 8, p. 316-317, 2003.

ZHAO, Q.L.; HUANG, C.Y.; HUANG, Y.; WANG, J.F.; LIU, J. Study on acute pancreatitis-associated lung injury induced by L-arginine in mice. **Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.** , v. 35 (6), p. 839-842, 2004.

ZHOU, W.; LEVINE, B.A.; OLSON, M.S. Platelet activating factor: A mediator of pancreatic inflammation during cerulein stimulation. **Am J Pathol.**, v.142, p. 1504–1512, 1993.

ZOGHBI, M.G.B.; MAIA, J.G.S.; LUZ, A.I.R. Volatile Constituents from Leaves and Stems of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **J. Essent. Oil. Res.**, v. 7, p. 541, 1995.