



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

**Novo modelo de pancreatite crônica alcoólica em murinos: Aspectos
inflamatórios, hiperalgesia visceral e fibrogênese.**

ORIENTANDO: Álvaro Xavier Franco

ORIENTADOR: Prof.: Dr.: Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza

FORTALEZA

2019

ÁLVARO XAVIER FRANCO

**Novo modelo de pancreatite crônica alcoólica em murinos: Aspectos
inflamatórios, hiperalgesia viscerele fibrogênese.**

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em
Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará para
obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Prof.: Dr.: Marcellus Henrique Loiola Ponte de
Souza

FORTALEZA

2019

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

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

- F897n Franco, Álvaro Xavier.
Novo modelo de pancreatite crônica alcoólica em murinos: Aspectos inflamatórios, hiperalgesia visceral e fibrogênese / Álvaro Xavier Franco. – 2019.
92 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loliola Ponte de Souza.
1. Pancreatite. 2. Pancreatite crônica. 3. hiperalgesia visceral. 4. Células estelares. 5. Fibrose. I. Título.

CDD 610

ÁLVARO XAVIER FRANCO

**Novo modelo de pancreatite crônica alcoólica em murinos: Aspectos
inflamatórios, hiperalgesia visceral e fibrogênese**

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da
Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Doutor em Ciências
Médicas

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof.: Dr.: Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza

Prof.: Dr.: Pedro Marcos Gomes Soares

Prof.: Dr.: David Neil Criddle.

Prof.: Dr.: André Luiz dos Reis Barbosa

Profa.: Dra.: Deysen Kerlla Fernandes Bezerra Girão

DEDICATÓRIA

In memoriam a minha tia Eliane de Lima Marcelino pelas palavras de incentivo, a minha mãe e a minha esposa, que me deram todo o apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.: Dr.:**Emmanuel Prata de Souza** e Prof. Dr. **Pedro Marcos Gomes Soares** pela oportunidade de ingressar na iniciação científica e por ter acreditado na minha continuidade na pesquisa.

A técnica de laboratório **Eleonora Rodrigues** pelos ensinamentos na graduação, por seus conselhos de mãe e por sua amizade.

In memoriam ao Prof.: Dr.:**Ronaldo de Albuquerque Ribeiro** por ter me acolhido no LAFICA quando, aluno de apoio técnico e por ter me dado a oportunidade de amadurecimento nas práticas científicas e por ser um exemplo de um grande pesquisador.

Ao meu orientador Prof.: Dr.:**Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza** por ter aceitado de braços abertos à orientação deste trabalho, a sua paciência e incentivo a ciência.

A Profa.: Dra.:**Gerly Anne Castro Brito**, pelas suas contribuições do seu laboratório NEMPI onde tive oportunidade de aprender.

A **Vandinha** por sua colaboração durante meu período no LAFICA.

Aos amigos **Deysen Girão, Kaira Emanuella, Marcos Aurélio, Carlos Monteiro, Cecília Mendes** e **Paulo Roberto**, por terem me ajudado em todos os processos experimentais que foram de suma importância para realização e finalização do trabalho, e **Conceição Martins** e **Priscila Justino** pela amizade construída durante anos.

Aos professores, alunos e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas.

Ao **CNPq, CAPES** pelo apoio financeiro.

RESUMO

A pancreatite crônica (PC) é definida como uma doença inflamatória progressiva podendo levar a alterações morfológicas irreversíveis do pâncreas. O processo inflamatório é persistente mesmo após a supressão de fatores nocivos e o parênquima pancreático é substituído por tecido fibroso, podendo culminar na perda da função. A caracterização de um modelo de pancreatite crônica alcoólica investigando os aspectos inflamatórios, hiperalgesia e fibrinogênese, pode trazer um maior entendimento da sua fisiopatologia. A pancreatite crônica experimental foi induzida em *Camundongos Swiss*, divididos aleatoriamente em grupo controle e grupos POA 1, 21, 29 e 44 dias, recebendo dose de ácido palmitoleico (POA) associado ao etanol (1,35 g/Kg) nas concentrações de 150, 75 e 37,5 mg/Kg via intraperitoneal com intervalo de 1 (uma) hora entre as aplicações. Os animais foram eutanasiados e foram coletados sangue, fezes e o pâncreas, para análises bioquímicas (amilase, lipase, glicose, tripsina, MPO e α -SMA) e histopatológica (atrofia glândular, fibrose e infiltrado de células monocelulares). A sobrevivência dos animais com pancreatite crônica experimental foi em média de 56,06 % e foram percebidas substituição do tecido pancreático por fibrose. Observamos também, alterações bioquímicas importantes como na lipase, glicose, tripsina, mieloperoxidase, Sudam III e presença de expressão aumentada de α -SMA, sendo um marcador de células estelares que participam do processo de fibrose. Alterações no limiar nociceptivo foram observadas, sendo persistente até o último período experimental. A aplicação de POA em associação com o etanol intraperitoneal consiste em um novo modelo com evidências de alterações estruturais, bioquímicas e funcionais descritas na prática clínica, abrindo novas investigações e perspectivas para estudos da fisiopatologia dessa doença, bem como de novas estratégias de modulação farmacológica.

Palavras-chave: Pancreatite; Pancreatite crônica; Ácido Palmitoleico; hiperalgesia visceral; Fibrose; Células estelares.

ABSTRACT

Chronic pancreatitis (CP) is a progressive inflammatory disease characterized by irreversible morphological changes of the pancreas. The inflammatory process is persistent after deletion of deleterious factors and the pancreatic parenchyma is replaced by fibrous tissue, leading to loss of function. The characterization of a model of chronic alcoholic pancreatitis investigating the inflammatory aspects, hyperalgesia and fibrinogenesis, provides the understanding of its pathophysiology. Experimental chronic pancreatitis induced in Swiss mice, separated in control group and POA groups 1, 21, 29 and 44 days, with doses of palmitoleic acid (POA) associated to ethanol (1.35 g / kg) at concentrations of 150 , 75 and 37.5 mg / kg intraperitoneally with an interval of 1 (one) hour between the applications. The animals were euthanized and blood, faeces and pancreas were collected for biochemical analyzes (amylase, lipase, glucose, trypsin, MPO and α -SMA) and histopathology (glandular atrophy, fibrosis and monocellular cell infiltration). The survival of animals with experimental chronic pancreatitis was on average 56.06% and pancreatic tissue replacement was observed by fibrosis. There were alterations of important biochemical enzymes in lipase, glucose, trypsin, myeloperoxidase, Sudan III and presence of increased expression of α -SMA, a marker in the stellate cell that participate in the fibrosis process. Alterations in the nociceptive threshold were observed, persistent at the last experimental period. The application of POA associated with intraperitoneal ethanol consists of a new model with evidence of structural, biochemical and functional changes described in clinical practice, evidencing investigations and perspectives for studies of the pathophysiology of this disease, as well as new pharmacological modulation strategies.

Keywords: Pancreatitis; Chronic pancreatitis; Palmitoleic Acid; Visceral hyperalgesia; Fibrosis, Stellate cell.

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Resumo dos modelos encontrados na literatura, na tentativa de padronizar o modelo de cronicidade para elucidar a fisiopatologia da pancreatite crônica	31
----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Protocolo experimental para indução da pancreatite aguda e crônica acoólica	35
Figura 2	Análise histopatológica do tecido pancreático	46
Figura 3	Análise de fibrose pela coloração de <i>Picrosirusred</i>	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	A pancreatite crônica resulta na mortalidade acentuada	44
Gráfico 2	Características morfológicas apresentadas na pancreatite	50
Gráfico 3	Baixa atividade de mieloperoxidase na pancreatite crônica	52
Gráfico 4	Alterações bioquímicas no curso da pancreatite	55
Gráfico 5	Esteatorreia presente na pancreatite crônica	56
Gráfico 6	Hiperalgisia visceral na pancreatite crônica	58
Gráfico 7	Aumento da expressão de α-SMA pelas células estelares na pancreatite crônica	60
Gráfico 8	Pancreatite crônica cursa com a deposição de colágeno no pâncreas	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADO - adenosina
ANOVA – análise de variância
ASC – proteína *apoptosis-associated speck-like*
ATP – trifosfato de adenosina
Ca⁺ - íon cálcio
CCK - colecistocinina
CCKR – receptor ativado por colecistocinina
CEL - lipase carboxil-éster
CEPA – Comitê de Ética em Pesquisa Animal
DRG – gânglios da raiz dorsal
DBTC - Dicloridrato de dibutilestanho
DMAB - 4 - (dimetilamino) benzaldeído
DTNB – ácido 5,5-ditiolbis (2-nitrobenzóico)
EDTA – ácido etilenodiamino-tetra-acético
EPM – erro-padrão da média
EUA- Estados Unidos da América
FA – ácidos graxos
FAEEs- etil-estéres de ácidos graxos
GAP-43 - proteína associada ao crescimento 43
H⁺ - íon hidrogênio
HE – hematoxilina-eosina
HTAB – brometo de hexadeciltrimetilamônio

IL - interleucina
K⁺ - íon potássio
LPS - lipopolissacarídeo
MEC - matriz extracelular
MPO – mieloperoxidase
mmol - milimol
Na⁺ - íon sódio
NF-κB- fator nuclear κB
NGF – fator de crescimento neuronal
PA – pancreatite aguda
PC – pancreatite crônica
pH – potencial hidrogeniônico
POA- ácido palmitoléico
POAEE - étil éster de ácido palmitoléico
PSCS – Células Estrelares
ROS - Espécies reativas de oxigênio
SNC - sistema nervoso central
SP – substância P
TLR – receptor *Toll-like*
TM – transmembrana
TMP – 1,1,3,3 tetraetoxipropano
TNF-α – fator de necrose tumoral α
TRPV – receptor vanilóide de potencial transitório

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Pâncreas: anatomia e fisiologia	17
1.2 Pancreatite.....	18
1.3 Epidemiologia da pancreatite crônica no mundo	19
1.4 Diagnóstico da pancreatite crônica	21
1.5 Fatores de riscos da pancreatite crônica	22
1.6 Fisiopatologia da fibrose na pancreatite crônica: participação das Células estrelares.....	24
1.7 Dor na pancreatite	26
1.8 Modelos de pancreatite crônica	28
2. JUSTIFICATIVAS E RELEVÂNCIA	34
3. OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo geral:.....	35
3.2 Objetivo específico:.....	35
4. MATERIAS E MÉTODOS	36
4.1 Animais utilizados para o modelo experimental	36
4.2 Protocolo experimental para indução da pancreatite crônica acoólica	36
4.3 Análise da sobrevivência dos animais no protocolo de indução da pancreatite crônica.....	38
4.4 Análise Histopatológica do pâncreas através da coloração hematoxilina e eosina.....	38
4.5 Análise Histopatológica de fibrose pancreática através da coloração de Picrosirius red.....	38
4.6 Determinação da atividade de enzima mieloperoxidase (MPO)	39
4.7 Determinação dos níveis séricos de α -Análises, lipase e glicose	39
4.8 Determinação da atividade de Tripsina pancreática	40
4.9 Avaliação de esteatorreia nas fezes dos animais após a indução da pancreatite crônica	40
4.10 Teste de hiperalgesia visceral mecânica abdominal (Von Frey).....	41
4.11 Western blotting para α - actina de Músculo liso (α -SMA)	42
4.12 Determinação do teor de Hidroxiprolina.....	43
4.13 Análise Estatística.....	44

5. RESULTADOS	45
5.1 A pancreatite crônica resulta na mortalidade acentuada	45
5.2 O processo de pancreatite crônica promove alterações no tecido pancreático como: infiltrado mononuclear e polimorfonucleares e atrofia glandular .	47
5.3 Presença de fibrose no processo de pancreatite crônica	49
5.4 A pancreatite crônica promove atrofia glândular, presença de fibrose e infiltrado de células monocelulares	51
5.5 Pancreatite crônica alcoólica experimental não cursa com o aumento da atividade de mieloperoxidase	53
5.6 Alterações dos níveis de α -amilase, lipase e atividade de tripsina na pancreatite crônica experimental alcoólica.....	55
5.7 Aumento de esteatorreia na pancreatite crônica	58
5.8 Hiperalgisia visceral presente no processo da pancreatite crônica	59
5.9 A pancreatite crônica cursa com a expressão da Alfa Actina de musculo liso (α -SMA) no tecido pancreático.....	61
5.10 Aumento nos níveis de hidroxiprolina no desenvolvimento da pancreatite crônica.....	63
6. DISCUSSÃO	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
9. ANEXOS	95

1. INTRODUÇÃO

1.1 Pâncreas: anatomia e fisiologia

O pâncreas é uma glândula mista acessória ao sistema digestivo, localizada no retroperitônio, sendo dividida em cabeça, corpo e cauda, (LONGNECKER, D.S. 2014). A função endócrina do pâncreas corresponde em média 20 % de sua atividade, enquanto que, aproximadamente 80% está envolvida com sua função exócrina (LEUNG, P.S. et al., 2010). As células que fazem parte da porção endócrina do pâncreas, são denominadas de ilhotas de *Langerhans*, distribuídas por toda a glândula, porém são relativamente concentradas na cauda do pâncreas (WANG, et al., 2008). Cerca de 75% a 80% do tecido pancreático, é formado por células beta, que produzem insulina, de 10% a 20% são células alfa, produtoras de glucagon, cerca de 5% são células delta que contêm somatostatina com a produção de polipeptídeo pancreático (BRADLEY, P.P. et al., 2012).

O suprimento sanguíneo deste órgão é realizado pelas artérias mesentérica superior e celíaca e a circulação portal é responsável pela drenagem venosa (KHOKHAR, et al., 2004). Sua regulação ocorre por meio de hormônios e sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático. O hormônio colecistocinina (CCK) é liberado por intermédio de células especiais do intestino e apresenta um efeito estimulante sobre a função exócrina do pâncreas. (MORISSET, J. et al., 2008).

A porção exócrina do pâncreas, corresponde à maior parte do tecido, constituída por células, agrupadas em lóbulos, classificados como ácinos, os quais estão conectados aos ductos pancreáticos. A estrutura do ácino consiste em aglomerados de células epiteliais secretoras com um lúmen no centro, denominado canalículo intercelular (CERANOWICZ,P. et al., 2015). Nessa região se inicia o sistema ductal estendendo-se até o duodeno. As principais funções da porção exócrina do pâncreas são: secreção de bicarbonato (HCO_3^-), tendo o papel de neutralizar o pH ácido do advindo do conteúdo gástrico que naturalmente flui para o interior do duodeno, além das funções de síntese, armazenamento e secreção de enzimas digestivas (MURPHY, J. A. et al., 2017).

As principais enzimas digestivas encontradas no suco pancreático são a tripsina, quimiotripsina, carboxipolipeptidases, ribonucleases, desoxirribonucleases (enzimas proteolíticas), amilase pancreática, lipase pancreática e fosfolipase (PENDHARKAR; ASRANI; MURPHY, 2017). As enzimas proteolíticas encontram-se

sob a forma de pró-enzimas inativas ou zimogênios (tripsinogênio, quimiotripsinogênio, procarboxipolipeptidases) podendo causar o desenvolvimento da pancreatite.

1.2 Pancreatite

De um modo geral, o processo patogênico da pancreatite ocorre por meio de reações inflamatórias do pâncreas, caracterizada por edema pancreático, necrose acinar, hemorragia e necrose lipídica, bem como inflamação e infiltração perivascular do pâncreas, podendo ser sistêmica, atingindo outros órgãos do corpo. (LERCH, M.M. et al., 2012).

A pancreatite é classificada de duas formas, aguda e crônica, sendo estas, distúrbios gastrointestinais que podem causar morbidade significativa, reduzindo a expectativa de vida. A pancreatite aguda (PA) é uma doença inflamatória do pâncreas exócrino, que pode envolver uma complexa sequência de eventos fisiopatológicos, muitos dos quais ainda são desconhecidos, tendo como característica um rápido desenvolvimento, podendo levar a complicações fatais como insuficiência pulmonar, renal e circulatória dependendo da gravidade e de sua duração (HEGYI, et al., 2011).

Sucessivos episódios de PA podem levar a um quadro de pancreatite crônica (PC) (FRULLONI, L. et al., 2010). A PC é definida como uma doença inflamatória progressiva que pode conduzir alterações morfológicas irreversíveis ao pâncreas, como presença de fibrose, podendo culminando em alterações teciduais. Estas alterações desenvolvidas na PC persistem mesmo após a supressão dos fatores nocivos, podendo culminar na perda da função (LAYER, P. et al., 2005). Duas variações da PC, são descritas, onde a primeira variação é proveniente de grandes ductos pancreáticos com calcificação do mesmo (BRAGANZA, J.M et al., 2011; CHAUHAN, S. et al., 2010) e a segunda variação também com calcificação proveniente de pequenos ductos pancreáticos (CAHEN, et al., 2007).

A PC é representada por um conjunto de diferentes distúrbios e complicações que convergem ao longo do tempo, resultando em uma síndrome terminal, envolvendo lesões recorrentes ou sustentadas no pâncreas, podendo ser desencadeada pelo uso abusivo de álcool, gorduras e tabagismo. Essas lesões são caracterizadas por uma sequência de inflamação, resolução e regeneração seguido pela destruição progressiva da glândula, desenvolvendo várias

complicações. Este processo progressivo, caracteriza-se por infiltrado de células mononuclear, fibrose, perda de ácinos e ilhotas de *Langerhans* podendo evoluir gravemente como uma perda severa na função do pâncreas (WHITCOMB, D. C. et al., 2016). Essa perda funcional pode afetar tanto a porção endócrina (causando diabetes *mellitus*) como a porção exócrina (resultando em deficiência de amilase, lipase e perda de peso) (BORNMA, et al., 2003).

A pancreatite crônica tem sua etiologia bastante diversificada, sendo o consumo alcoólico em demasia, apontado como uma das principais causas dessa patologia (WILSON, J.S et al., 2003). Segundo Friedman e colaboradores (2011) os casos de pancreatite crônica se devem ao consumo abusivo do álcool. Os dados apontam que, de 5 - 10% dos indivíduos, que ingerem álcool em excesso, desenvolvem pancreatite crônica. Provavelmente, outros fatores interferem, promovendo vulnerabilidade a essa doença, como por exemplo, fatores genéticos e dietéticos, sendo esta última associação pouco compreendida devido às dificuldades das pesquisas (LIN et al., 2001). Além disso, os mecanismos fisiopatológicos pelos quais se desenvolvem esse processo inflamatório crônico, ainda não foram totalmente elucidados em vista o fato de que, nenhum modelo experimental em animais (TOSKES et al., 2006), é suficientemente capaz de reproduzir os efeitos da PC nos seres humanos (APTE, M. V. et al., 2005).

1.3 Epidemiologia da pancreatite crônica no mundo

As condições clínicas da PC constitui ônus econômico a saúde nos países. Por exemplo nos EUA, há a prevalência entre 5,6 a 24,2 milhões de pessoas, os dados de hospitalizações e consultas médicas referentes a doenças pancreáticas benignas, entre as quais a pancreatite crônica, está presente no ano 2000, aproximadamente foram gastos 2,5 mil milhões de US dólares, já a prevalência na França é de 26 casos por 100 000 pessoas (VIOLA et al., 2008). A prevalência também não é diferente das estimativas no Japão (BALESTRIERI, M.L. et al., 2008; MORENO, C. et al., 2006), mas é consideravelmente menor do que a estimativa encontrada na Índia, sendo 114-200 por 100 000 habitantes (MORENO, C. et al., 2006).

A epidemiologia da pancreatite crônica vem sendo estudada com base populacional sobre a sua incidência, prevalência e história natural da doença. Assim, o que se sabe dos conhecimentos epidemiológicos deste distúrbio está sendo

derivado de estudos que são baseados em dados obtidos dos registros de seguro ou dados hospitalares, tendo suas limitações pela qualidade dos dados e pela falta de uma confirmação do diagnóstico. A PC é uma importante fonte de morbidade/mortalidade nos Estados Unidos e na Europa (MUNIRAJ T. et al., 2014).

Pancreatite aguda é o diagnóstico gastrointestinal mais comum nos Estados Unidos, enquanto a pancreatite crônica não está entre os 15 diagnósticos doenças relacionadas a trato gastrointestinal (PEERY, A. F. et al., 2012). A taxa anual e incidência relatadas no mundo tem variações nos países e são aproximadamente entre 5 a 14 casos por 100.000 indivíduos, tendo uma prevalência de aproximadamente 30-50 casos por 100.000 indivíduos no mundo (HIROTA, M. et al., 2014). Porém, a prevalência da PC pode ser tão alta quanto, o grande problema é a subestimação dos verdadeiros números de casos devido a várias razões, incluindo pacientes sem a definição da doença e qualidade do diagnóstico (LEVY, P. et al., 2014).

A prevalência de pancreatite crônica aumenta com idade e o diagnóstico varia entre 51 e 58 anos (HIROTA, M. et al., 2014), porém nos mais jovem, está relacionada principalmente a fatores genéticos (SCHWARZENBERG, S. J. et al., 2015; GIEFER, M. J. et al., 2017), além disto os critérios de diagnósticos ainda são debatidos (SHIMOSEGAWA, T. et al., 2010). Uma estimativa precisa da proporção de pacientes que progridem desde a fase aguda até a fase crônica pancreatite ainda permanece elusiva. A PC tem sido tradicionalmente considerada uma doença relacionadas aos homens, especialmente pela ingestão elevada de álcool (LEVY, P. et al., 2014).

No entanto, outros estudos sugerem que a prevalência de pancreatite crônica em mulheres pode ser mais comum do que se acreditava anteriormente (YADAV, D. et al., 2011; COTE, G. A. et al., 2011). Uma análise da *North American Pancreatitis Study 2* (NAPS2), o maior estudo multicêntrico prospectivo apurado em pacientes com pancreatite crônica nos Estados Unidos, revelou que, no período de 2000-2014, 45% de todos os pacientes com pancreatite crônica foram mulheres (ROMAGNUOLO, J. et al., 2016).

Já uma revisão sistemática no estudo de Xiao e colaboradores (2016), a incidência global de pancreatite crônica é de 10 por 100.000 habitantes em geral por ano. Os estudos que possam investigar variações na incidência de pancreatite

crônica, em todo o mundo, estão em falta e devem ser prioridades para pesquisas futuras.

A PA recorrente desenvolveu-se em 21% (IC95% 17–26%) dos pacientes após o primeiro episódio da pancreatite aguda, e a pancreatite crônica desenvolveu-se em 36% (IC95% 20–53%) dos pacientes após a PA recorrente (YADAV, D. et al., 2007).

1.4 Diagnóstico da pancreatite crônica

Frequentemente, os primeiros sinais da doença que levam os pacientes a procurarem o atendimento médico, são: as dores abdominais, que se localizam na região epigástrica irradiando para as costas, a perda de peso corporal (até 80% dos doentes) e esteatorreia (em <50% dos doentes). Cerca de 26-80% dos pacientes com pancreatite crônica numa fase mais tardia, possuem diabetes *mellitus*. Por outro lado, alguns pacientes não se queixam de dor, apesar das alterações patológicas apresentadas nos exames de radiologia e a razão para este fato é desconhecida (RICKELS, M. R. et al., 2012 e OLESEN, S. S. et al., 2014).

Diante dos primeiros sinais apresentados pelos os indivíduos acometidos pela PC até o seu diagnóstico, leva em média de 30 a 55 meses em alcoólatras, já para não-alcoólatras, o diagnóstico é ainda mais tardio (em média de 81 meses). A principal razão para um diagnóstico tardio é a velocidade das variações no curso natural da doença, tendo em vista que os sintomas clínicos podem ser desde uma dor abdominal até caquexia (HOFFMEISTER, A. et al., 2013).

Os critérios de consenso para diagnosticar a pancreatite aguda e pancreatite crônica ainda não foram bem estabelecidos, há uma discussão sobre as definições e implicações clínicas da pancreatite crônica, sendo assim, um diagnóstico mais precoce e terapias subsequentes podem prevenir a destruição irreversível do pâncreas (WHITCOMB, D. C. et al., 2016).

A comunidade japonesa de pancreatologia estabeleceu critérios para um diagnóstico precoce da pancreatite crônica (SHIMOSEGAWA, T. et al., 2010), incluindo quatro sintomas clínicos: recorrência dor abdominal superior, enzima pancreática com níveis séricos anormais, função exócrina pancreática anormal, uso contínuo de álcool como fator de predisposição, bem como os achados de exames de imagem (ultrassonografia endoscópica ou endoscópica colangiopancreatografia retrógrada (CPRE)). O diagnóstico precoce de pancreatite crônica pode ser feito

usando os critérios japoneses se for encontrado pelo menos dois dos quatro sintomas clínicos listados, associado aos achados de exames de imagem. A Secretaria de Atenção à Saúde, aprovou um protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Insuficiência Pancreática Exócrina com número de portaria nº 112, de 04 de fevereiro de 2016, seguindo os mesmos critérios citados acima, sendo um grande passo para o diagnóstico da PC na saúde pública.

1.5 Fatores de riscos da pancreatite crônica

A causa mais prevalente de pancreatite crônica é o consumo abusivo de álcool. Nos países ocidentais está relacionada a 40-70% de todos os casos (CONWEIL, D. L. et al., 2017). Os mecanismos fisiopatológicos ainda são mal compreendidos, mas a toxicidade direta dos metabólitos do álcool nas células acinares, podem inibir o retículo endoplasmático e suas atividades subsequentes, aumento do estresse oxidativo, podendo desempenhar um papel importante no processo (THROWER, E. et al., 2015).

Os estudos da *North American Pancreatitis Study 2* (NAPS2), mostram que o álcool não conferiu o risco de pancreatite crônica até um limiar de 5 bebidas por dia (60-80 gramas de etanol) (YADAV, D. et al., 2010). Contudo, o risco de pancreatite crônica aumenta claramente com níveis mais elevados de consumo de álcool (LIN, Y. et al., 2001).

O tabagismo sendo aumentado de maneira dose-dependente é um fator de risco relacionado a PC, em fumantes, o risco relativo de desenvolvimento da PC é estimado em 2,8 % (REBOURS, V. et al., 2012). Além disto temos a predisposição genética (GROCOCK, C. J. et al., 2010; WHITCOMB, D. C. et al., 2013) e processos de obstrução, podem promover a pancreatite crônica (BERTIN, C. et al., 2012).

Alguns mecanismos foram descritos com o intuito de elucidar a fisiopatologia da pancreatite crônica (PC), como por exemplo: a presença de processos inflamatórios seguidos de necrose e presença de fibrose (KLOPPEL, G. et al., 1992), ativação de células estelares pancreáticas (YADAV, D. et al., 2010; PANDOL, S. J. et al., 2016), disfunção ductal (YAMAGUCHI, M. et al., 2017) e por fim o metabólitos do álcool e o estresse oxidativo, podendo alterar enzimas pancreáticas (LEUNG, P. S. et al., 2009; SENDLER, M. et al., 2013).

Como relatado anteriormente a PC está relacionada a episódios recorrentes de uma pancreatite aguda (PA), promovendo processo inflamatório e cicatrização

(FRULLONI, et al., 2010), porém ainda se sabe qual o ponto exato em que esses episódios passam a ter uma conotação crônica.

Dentro destes processos repetidos de lesões agudas, temos como exemplo as alterações das enzimas pancreáticas que estão associadas com o álcool, a sensibilização das células acinares podem ativar de forma intracelular e prematura os zimógenos, este por sua vez é um dos mecanismos propostos para a patogênese da pancreatite alcoólica (PURROHIT et al., 2003). O álcool também potencializa o efeito da colecistoquinina (CCK), a qual também promove a ativação prematura de zimógenos, levando a autodigestão do tecido pancreático (PURROHIT et al., 2003).

Outro evento importante na fisiopatologia da pancreatite, são as vias de metabolização do álcool. O pâncreas pode metabolizar o álcool pelas vias oxidativa e não-oxidativa, encontrando-se exposto aos efeitos diretos do acetaldeído e etil-ésteres de ácidos graxos, respectivamente. O equilíbrio entre a via oxidativa e a não-oxidativa pode ser essencial na determinação dos efeitos tóxicos do excesso de álcool. Dessa forma, o metabolismo do álcool, bem como a síntese de metabólitos deletérios como o ácido palmitoleico (POA), favorecem o desenvolvimento da doença pancreática alcoólica (WILSON, J. S. et al., 2003). Na via oxidativa, além da ação da álcool desidrogenase (ADH), o mesmo é metabolizado pelo citocromo P450 2E1 (CYP2E1), resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem desencadear o dano tecidual através da ativação do fator de transcrição NF- κ B e aumento de expressão de citocinas pró-inflamatórias (PURROHIT, et al., 2003), para o pâncreas, essa via não parece tão importante, sendo a via não-oxidativa a mais envolvida na fisiopatologia da pancreatite.

Já a via não-oxidativa degrada o álcool e podem obter etil-ésteres de ácidos graxos (FAEEs), dentre eles o ácido palmitoleico (POA) (GUKOVSKAYA, A.S. et al., 2002). Estudos mostram que o acúmulo de FAEEs no pâncreas de pacientes, podem desenvolver o processo de pancreatite alcoólica, em contraste com outros órgãos comumente danificados pelo álcool (LAPOSATA, E.A. et al., 1986). O trabalho de Huang e colaboradores (2014) mostra que a promoção da via não-oxidativa, em resposta ao álcool/POA, com inibição da via oxidativa, induzia a disfunção de Ca^{2+} mitocondrial promovendo necrose. Esse novo modelo experimental de pancreatite alcoólica baseada na combinação de álcool e POA para induzir danos no pâncreas exócrino, está sendo apresentado como modelo de

pancreatite aguda tanto *in vitro* como *in vivos* sugerindo como uma potencial intervenção terapêutica.

A patogênese da pancreatite crônica ainda é pouco entendida, porém claramente o uso de álcool é o principal fator de risco (LOWENFELS, A.B. et al., 1994). Existem hipóteses sobre a patogênese da pancreatite crônica, a mais aceita é de fato a degradação de células acinares pelo álcool reforçando que a PC é uma consequência de episódios recorrentes de PA. Os danos no parênquima pancreático podem levar a um processo de infiltração de linfócitos, macrófagos e fibroblastos. Esta hipótese estaria de acordo com ativação precoce do zimogênio intracelular no pâncreas, além disso existem associações com mutações no gene responsável pelo tripsinogênio. A maioria das evidências nos estudos clínicos e experimentais, sugerem que esta hipótese prevê a fisiopatologia da pancreatite crônica com maior precisão (AGHDASSI, A.A. et al., 2011).

Diante desses fatores, torna-se importante determinar a fisiopatologia da pancreatite crônica associada ao álcool.

1.6 Fisiopatologia da fibrose na pancreatite crônica: participação das Células estelares

A fibrose do pâncreas é uma característica patológica central de pancreatite crônica (DIMAGNO, E.P. et al., 1993). No entanto, os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da fibrose na PC ainda não estão bem estabelecidos (KENNEDY, R.H. et al., 1987). Algumas evidências mostram que a ativação persistente das células estelares, desempenha um papel vital na fibrogênese do tecido pancreático (LONGNECKER, D.S. et al. 1983; USCANGA, L. et al., 1987).

As células estelares pancreáticas (CEP) correspondem cerca de 4 a 7% de todas as células no pâncreas, localizando-se na região periacinar do pâncreas exócrino (SUDA K. et al., 1992) com a capacidade de armazenar gotículas de gordura, semelhante a células estreladas hepáticas (KIMURA, et al., 1995). No pâncreas normal, as CEP estão em repouso e podem ser identificadas pela presença de vitamina e gotículas de gordura contidas no citoplasma. Em resposta a inflamação do pâncreas ou lesão, as CEP tendem a perder as suas gotículas de gordura e expressar Alfa Actina de Músculo Liso (α -SMA) e proteínas da Matriz Extracelular (MEC) (SANDGREN, E.P et al., 1990; BOCKMAN, D.E et al., 1992).

As CEP possuem projeções em forma de estrelas por meio das quais estabelecem contato entre elas, assim como as células acinares ductais e endoteliais (MOLERO, X. et al., 2003). Estudos em cultura têm identificado numerosos fatores de crescimento como: citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, e TNF- α), fatores de crescimento (PDGF e TGF- β), angiotensina II e espécies reativas de oxigênio (ROS), liberadas pelas células vizinhas e por leucócitos recrutados em resposta ao dano pancreático.

As CEP ativadas, podem produzir fatores autócrinos, tais como PDGF, TGF- β , citocinas (IL-1, IL-6 e TRAIL) e ciclooxigenase-2 (COX-2), que podem perpetuar o fenótipo das células ativadas (WILSON, J.S. et al., 2003; JASTER, R. et al., 2004; OMARY, M. B. et al., 2007), além disto, uma variedade de mediadores pró-fibróticos e pró-inflamatórios podem ser liberados durante o desenvolvimento da pancreatite.

1.7 Dor na pancreatite

A dor é um sintoma frequente, incapacitante e clinicamente dominante e está presente na maioria dos indivíduos acometidos com a pancreatite crônica (LOHR, J. M. et al., 2017), podendo ser associado a vários fatores multimodais, as estratégias terapêuticas incluem o uso de medidas analgésicas e são atualmente utilizadas na pancreatite crônica, porém o uso dessas medidas podem ser inespecíficas, gerando baixa eficácia, e muitas vezes podem ser acompanhadas de efeitos colaterais (CORNMAN-HOMONOFF, J et al., 2017).

A dor na pancreatite crônica pode apresentar-se de forma intensa e intermitente, diminuindo a qualidade de vida dos indivíduos (WHITCOMB, D. C. et al., 2016; PEERY, A. F. et al 2012). A maioria dos estudos tem se concentrado em anormalidades e no aumento da pressão no sistema de ductos como causas da dor. No entanto, outros estudos encontraram alterações neuroplásticas mal adaptativas do sistema nervoso central e em muitos casos, a dor possivelmente tem origem neuropática (DEMIR, I. E. et al., 2015; POULSEN, J. L. et al., 2013).

Os fatores que inicialmente ativam as vias de dor na pancreatite ainda não estão claros, há evidências pelo menos em modelos de pancreatite aguda, ocorre a digestão do tecido adiposo retroperitoneal por extravasamento de lipase e fosfolipase A2, podendo desencadear fatores inflamatórios locais e levar à geração de estímulos nociceptivos. Além disso, a obstrução ductal por cálculos biliares ou compressão do ducto pancreático por pseudocistos, também poderiam levar à geração de dor. A necrose pancreática está fortemente associada a uma alta morbidade e excruciante dor. É provável ainda que ocorram danos nas terminações nervosas periféricas, gerando-se estados de dor neuropática (AGHDASSI, A. A et al., 2004; BHATIA, M. et al., 2005; LINDSAY, T. H. et al., 2005; SCHOLZ, J. et al., 2007).

Atualmente a dor associada à pancreatite crônica é multimodal, envolvendo complicações pancreáticas e peripancreáticas como a atuação de mecanismos viscerais extra-pancreáticos, e anormalidades nos nervos periférico e central. Esta multimodalidade pode explicar algumas falhas terapêuticas no tratamento da dor, que é baseada apenas em anormalidades morfológicas. Essas alterações intrapancreáticas são caracterizadas por plasticidade correspondente ao aumento do número de nervos e hipertrofia dos neurônios (DEMIR, I. E. et al., 2015).

A sensibilização de neurônios sensoriais pancreáticos e inflamação neurogênica também podem ter um papel importante no desenvolvimento da dor (DREWES, A. M. et al., 2008). A relação de dor e o processo inflamatório, inflamação podem estimular a digestão e secreção de enzimática promovendo alterações inflamatórias, sendo associadas com um aumento da excitabilidade de neurônios pancreáticos provenientes da expressão de nociceptores (SCHWARTZ, E. S. et al., 2011; ZHU, Y. et al., 2011).

Há existência desses fatores multimodais, dificultam o tratamento da dor, sendo mais simples, porém podendo trazer baixa eficiência tratar as causas secundárias, do que a dor primária proveniente do pâncreas (POULSEN, J. L. et al., 2013).

As alterações da pancreatite como pedras de estruturas do ducto pancreático são tipicamente tratadas de forma invasiva, incluindo a remoção dos calculos biliares por endoscópica, ressecções cirúrgicas e procedimentos de drenagem (LIEB, J. G. et al., 2009). O alívio da dor é visto em 60-80% dos casos, mas os dados deve ser interpretado com cuidado, uma vez que não foram realizados estudos controlados (DUMONCEAU, J. M. et al., 2012). O tratamento analgésico segue os princípios da "escada de alívio da dor" fornecida pela Organização Mundial da Saúde - OMS, com a introdução seriada de medicamentos analgésicos como: analgésicos simples; opioides fraco e opioides fortes que são titulados até que o alívio da dor seja obtido (JADAD, A. R. et al., 1995). Na maioria dos pacientes os analgésicos simples podem ser utilizado o paracetamol, porém, não são suficientes e em alguns aspectos utiliza-se a morfina (WILDER-SMITH, C. H. et al., 1999).

A terapia por opióides vem sendo discutida, porém é difícil e efeitos adversos que as drogas promovem, por tanto a discussões se fazem necessárias (DREWES, A. M. et al., 2008; OLESEN, S. S. et al., 2013). A administração transdérmica de opioides pode ser uma forma terapeutica usada para pacientes com problemas para a ingestão de comprimidos (NIEMANN, T. et al., 2000). Analgésicos adjuvantes ao tratamento podem ser incluídos, como uso de antidepressivos e anticonvulsivantes. Na pancreatite crônica, apenas a pregabalina foi investigada em estudo, observando um moderado alívio da dor comparado ao placebo (OLESEN, S. S. et al., 2011).

1.8 Modelos de pancreatite crônica

Modelos animais de pancreatite crônica foram criados e utilizados para verificar os mecanismos de patogênese, intervenções terapêuticas, e estudar a influência da inflamação no desenvolvimento de pancreatite. Os modelos *in vitro* podem ser usados para estudar estágio, processos de curto prazo que envolvem as respostas relacionadas às células acinares, outros modelos utilizando roedores buscaram reproduzir e desenvolver a doença na forma grave. Um dos modelos mais utilizados é pela administração de ceruleína (LERCH, M.M et al., 2013). Os modelos de pancreatite crônica estão resumidos na tabela 1.

A indução de pancreatite crônica tem fatores que possam reproduzir a doença em seres humanos, e esses fatores podem ser as combinações de ácidos graxos, uso do álcool, que tem uma grande relevância, pois são os principais estímulos nocivos ao desenvolvimento da doença em humanos, além disso outros modelos podem ser representados pelas doenças auto-imunes. Diante disso a necessidade de modelos, particularmente relacionados a pancreatite crônica, devem possibilitar uma maior caracterização encontradas em humanos (LERCH, M.M. et al., 2013).

O desenvolvimento destes modelos utilizam sua grande maioria roedores. Estes animais possibilitam uma padronização da espécie, tendo menos custos para manutenção. Dentre essas espécies os camundongos e ratos possuem uma manipulação fácil além de possibilitarem mudanças genéticas (animais *knockout* ou transgênicos), além disso, uma grande e ampla variedade de anticorpos estão disponíveis para o uso (LERCH, M.M. Et al., 1992).

Dois mecanismos gerais para o desenvolvimento da pancreatite crônica são descritos como: crises de pancreatite aguda evoluindo para a pancreatite crônica, um segundo mecanismo seria as sucessões de danos teciduais que perpetuam e levam a doenças crônicas sem a necessidade da presença de danos teciduais graves (AGHDASSI, A. A. et al., 2011).

Estudos utilizando modelos experimentais em animais, parecem mostrar que ambos os mecanismos podem levar a pancreatite, esses modelos de pancreatite crônica usam fatores mecânicos ou uso de substâncias pouco elucidadas e sem relevância na clínica. O uso de modelos crônicos associados ao álcool, podem mostrar levar a evidências da doença, que incluem a perda de massa células exócrinas e endócrinas do pâncreas, inflamação crônica, formação de calcificação intraductal, hipersensibilidade visceral e fibrose pancreática. O conhecimento do

desenvolvimento e a progressão da pancreatite crônica ainda é limitada, pelo fato de que a obtenção de amostras de tecidos humanos é difícil (AGHDASSI, A.A. et al., 2011).

Classificamos os modelos de pancreatite crônica de acordo com o seu mecanismo de indução. Adler, G e colaboradores (1985) já relatavam que os modelos mecânicos pela obstrução parcial ou completa do ducto pancreático eram frequentemente usados para produzir danos a tecido pancreático e essa técnica é utilizada até os tempos atuais, a progressão da doença neste tipo de modelo depende da espécie utilizada, por exemplo os ratos desenvolvem rapidamente a fibrose, além disto a facilidade de reprodução se dá pelos os ratos assim como os camundongos, possuem um único canal de saída do pâncreas, podendo ser facilmente obstruído, causando danos em todo pâncreas, por outro lado, a variação de múltiplos ductos no pâncreas, podendo acarretar obstrução apenas em um subconjunto de segmentos pancreáticos. (YAMASAKI, M. et al., 2006; OTANI, T. et al, 2006), tal variação e estimulação não pode ser suficiente para gerar a pancreatite crônica (MIYAUCHI, M. et al., 2006).

A obstrução crônica (por longos períodos) parcial ou intermitente do ducto, realizado em ratos, promove a hipertensão do ducto pancreático, mostrando que este modelo pode produzir reduções rápidas de bicarbonato e a estimulação de secreção de proteína como a secretina além da formação de proteínas intraductais aumentando a inflamação crônica e a fibrose ao longo de 2 semanas (YAMAMOTO M, et al., 2006).

Uma variação do modelo de obstrução do ducto que também vem sendo utilizada atualmente é a infusão de ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) no ducto principal do pancreático de ratos (PUIG-DIVI, V. et al., 1996). Esta mesma substância é empregada nos modelos de colite. A sua infusão no ducto pancreático provoca lesão fibrótica progressiva, estreitamento do ducto, atrofia da glândula, inflamação aguda e crônica em alta em ratos, assim sendo este modelo também pode ser utilizado para estudar a dor causada por pancreatite (ZHU, Y. et al., 2012).

A utilização de dieta alimentar rica em gordura em pode produzir uma pancreatite aguda severa, porém para obter aspectos de cronicidade, é necessário um período prolongado além de 24 semanas, além disto, outras características da doença não foram exploradas. Este modelo embora tenha poucos desafios técnicos, a dieta alimentar rica em gordura a longo prazo exigida para reproduzir a doença

torna-se caro e requer um acompanhamento rigoroso de ingestão (IDA, S. et al., 2010).

O álcool combinado a alimentação rica em gordura e obstrução parcial do ducto pancreático em cães mostrou a formação de lesões crônicas no pâncreas, semelhantes as observadas em seres humanos. No entanto, devido a custos e dentre outras razões é um modelo raramente usado. Os modelos de obstrução ductal podem ter uma vantagem para obtenção de um modelo crônico, mas é desafiadora, porém esse tipo de modelo só pode ser analisado por apenas 3 semanas (MIYAUCHI, M. et al., 2007).

Os fatores biológicos e químicos, também são utilizados no intuito de promover a PC, aplicações repetidas de ceruleína (proporciona o aumento da secreção de enzimas proteolíticas pancreáticas), em camundongos e ratos durante várias semanas, podem causar pancreatite crônica, porém sendo derivada de sucessivo processo de pancreatite aguda (NEUSCHWANDER-TETRI, B.A. et al., 2000). A ceruleína também causa deposição de colágeno e fibrose pancreática, mas essas características regridem quando as injeções são interrompidas (WATANABE, T. et al., 2009). Este modelo tem sido uma importante ferramenta para estudos dos efeitos inflamação no desenvolvimento de neoplasia pancreática (TREIBER, M. et al., 2011).

Um modelo utilizando ratos, mostra que a combinação de álcool e administração de lipopolissacarídeo (LPS) (VONLAUFEN, A. et al., 2007). Neste modelo acredita-se que o LPS promova lesão pancreática ativando vias imunes inatas associadas com a patogênese da pancreatite aguda humana incluindo receptores do tipo Toll 4 e CD14. Um estudo subsequente mostrou que quando o álcool foi administrado, houve ativação das células estreladas e a fibrose persistiu, mas foi revertida logo após que o consumo de álcool foi descontinuado (VONLAUFEN, A. et al., 2011).

A manipulação genética é uma técnica avançada que pode ser usada para produzir vários modelos de pancreatite crônica, essas alterações genéticas, são voltadas especificamente para modificação do ducto pancreático ou células acinares. Algumas destas alterações são homólogas às associadas com as doenças humanas, contudo, os efeitos das variantes genéticas podem ser complexas e produzir uma grande variação entre as espécies, por exemplo, interrupção dos genes que codificam o Regulador da Condutância Transmembrana

da Fibrose Cística (CFTR) em modelos com ratos, evidenciando uma pancreatite leve podendo ser agravada com a utilização de outros métodos como por exemplo, o uso da ceruleína (DIMAGNO, M.J. et al., 2005). A citocina inflamatória IL-1 é uma mediadora da pancreatite sendo expressa em alguns modelos de pancreatite crônica, a estimulação controlada promove a elastase no pâncreas em ratos causando características histológicas proeminentes da pancreatite, esses ratos transgênicos ao gene IL-1 não desenvolvem insuficiência pancreática exócrina nem endócrina no período de 8-10 meses de vida (MARRACHE, F. et al., 2008).

Alguns estudos verificam mutações nos genes que codificam a detecção de receptores de cálcio (CASR) (MUDDANA, V. et al., 2008) e carboxipeptidase A1 (CPA1), capaz de desencadear por uma resposta proteica, que ativa o sistema imunológico (BEER, S. et al., 2013), porém são associados a um pequeno aumento no risco de desenvolvimento da pancreatite crônica (WITT, H. et al., 2013).

Outras variantes genéticas foram relacionadas à ativação de sais biliares-lipase (também conhecida como lipase carboxil éster) possuem interações e mecanismos cada vez mais complexos (FJELD, K. et al., 2015; FJELD, K. et al., 2016).

Muitos modelos genéticos ainda não foram totalmente caracterizados, em relação ao fenótipo de desenvolvimento da pancreatite crônica humana. Dentro desses espectros de alterações genéticas, os estudos devem analisar cuidadosamente e realizar adequações para cada modelo e abordagens científicas (ARCHER, H. et al., 2006).

Como observou-se, a maioria dos mecanismos gerais para o desenvolvimento da pancreatite crônica, seria ocasionado por sucessões de danos teciduais provenientes da pancreatite aguda.

Recentemente, foi desenvolvido um modelo de pancreatite aguda em camundongos *Black* da linhagem C57BL, baseando-se na ativação de metabólitos da via não-oxidativo do álcool associado ao ácido palmitoléico (POA). Esse modelo cursa com alterações histológicas pancreáticas (necrose, edema e inflamação), indicativas de pancreatite aguda, bem como alterações de marcadores bioquímicos, incluindo tripsina, amilase e mieloperoxidase, além disto, o aumento da citocina IL-6, que está relacionada ao desequilíbrio no cálcio citosólico, podendo levar um importante dano mitocondrial, tanto *in vitro* como *in vivo*, assemelhando-se aos humanos, pelo uso abusivo do álcool (HUANG, W. et al., 2014).

Este modelo de estudo, foi utilizado como o ponto de partida para o nosso protocolo experimental crônico. Nosso estudo, busca padronizar um protocolo que promova lesões consecutivas ao pâncreas, possibilitando encontrar as alterações bioquímicas e estruturais características da pancreatite crônica, utilizando-se dos fatores de risco ligados ao desenvolvimento da mesma como o uso do álcool associado a ácidos graxos.

Tabela dos modelos de pancreatite crônica

Metodologia	Referências
Obstrução parcial ou completa do ducto pancreático	ADLER, G. et al., 1985.
Obstrução completa do ducto pancreático	OTANI, T. et al., 2006.
Obstrução completa do ducto pancreático associado ao TNBS	PUIG-DVIV, V. et al., 1996. YAMAMOTO, M. et al., 2006.
Dieta alimentar rica em gordura	IDA, S. et al., 2010.
Ingestão de álcool, obstrução parcial do ducto pancreático combinado a uma dieta alimentar rica em gordura	MIYAUCHI, M. et al., 2007.
Aplicação repetidas de ceruleína	NEUSCHWANDER-TETRI, B.A. et al., 2000. WATANABE, M. et al., 2009. TREIBER, M. et al., 2011.
Combinação de álcool e administração de Lipopolissacarídeo (LPS)	VONLAUFEN, A. et al., 2007.
Animais geneticamente modificados	DIMAGNO, M. et al., 2005. MARRACHE, F. et al., 2008. MUDDANA, V. et al., 2008. FJELD, K. et al., 2016.

Tabela 1:Resumo dos modelos encontrados na literatura, na tentativa de padronizar o modelo de cronicidade para elucidar a fisiopatologia da pancreatite crônica.

2. JUSTIFICATIVAS E RELEVÂNCIA

Existe escassez de estudos sobre os mecanismos fisiopatológicos que estão presentes na pancreatite crônica, em virtude da dificuldade experimental das condições nas quais ela é desencadeada nos humanos. Portanto, é de extrema relevância a elaboração de um modelo reprodutível que aproxime a pesquisa experimental da clínica.

A pancreatite crônica, apesar de não ter, na maioria dos países, uma elevada incidência, é uma patologia incapacitante, causando impacto no sistema de saúde e na qualidade de vida dos indivíduos acometidos, principalmente pelo quadro doloroso a ela associado (KRAYCHETE; GUIMARÃES, 2003).

As condições clínicas da PC constitui ônus econômico a saúde nos países. Por exemplo nos EUA, há a prevalência entre 5,6 a 24,2 milhões de pessoas, os dados de hospitalizações e consultas médicas referentes a doenças pancreáticas benignas, entre as quais a pancreatite crônica, está presente no ano 2000, aproximadamente foram gastos 2,5 mil milhões de US dólares.

Assim, o que se sabe dos conhecimentos epidemiológicos deste distúrbio está sendo derivado de estudos que são baseados em dados obtidos dos registros de seguro ou dados hospitalares, tendo suas limitações pela qualidade dos dados e pela falta de uma confirmação do diagnóstico. A PC é uma importante fonte de morbidade/mortalidade nos Estados Unidos e na Europa (MUNIRAJ T. et al., 2014).

O aumento das pesquisas sobre os mecanismos fisiopatológicos ainda permanecem em grande parte desconhecidos.

A fibrose progressiva do pâncreas, eventualmente, leva à perda disfunção do pâncreas e complicações sistêmicas, incluindo desnutrição, diabetes mellitus e tumor, além de não ter terapias específicas e eficazes que possam melhorar o quadro doloroso na pancreatite crônica.

Portanto, a proposta apresentada neste estudo é elaborar um modelo de pancreatite crônica, induzida por álcool e ácidos graxo, buscando identificar e compreensão da sua fisiopatologia.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Caracterizar um novo modelo de pancreatite crônica alcoólica em murinos, investigando os aspectos inflamatórios, hiperalgesiavisceral e fibrogênese.

3.2 Objetivo específico:

- Avaliar o processo inflamatório pela atividade de mieloperoxidase (MPO) e pelas alterações histopatológicas do tecido pancreático.
- Avaliar a função exócrina e endócrina a partir dos parâmetros bioquímicos de lipase, α -amilase, glicose, atividade de tripsina.
- Investigar a esteatorreia pelo sudam III.
- Investigar a cinética temporal da hipernocicepção visceral no curso do desenvolvimento da pancreatite crônica.
- Avaliar a presença de fibrose pelo ensaio de hidroxiprolina no tecido pancreático.
- Avaliar a expressão de Actina de músculo liso (α -SMA) expressas pelas células estelares pancreáticas.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Animais utilizados para o modelo experimental

Para os experimentos *in vivo* foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), com massa corpórea variando entre 25-30g. Os animais foram mantidos em condições ideais de luz e temperatura e tiveram acesso à água e à ração a vontade antes dos experimentos.

O projeto foi desenvolvido com observância dos princípios éticos e legais que regem as pesquisas com animais estabelecidos pela lei 11.794/08 e foi submetido e aprovado pela avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará - CEPA sobre o número de protocolo 24/2016.

4.2 Protocolo experimental para indução da pancreatite crônica alcoólica

O modelo proposto para a caracterização da pancreatite crônica, teve como ponto de partida, o trabalho de Huang e colaboradores (2014), nesse estudo foi induzida uma pancreatite aguda com POA na dose de 150mg/kg combinado ao álcool (1,35 g/Kg), via intraperitoneal, 2 aplicações com intervalo de 1h, em camundongos *Black* da linhagem C57BL, mostrando que a combinação do etanol e ácidos graxos tinham efeitos deletérios pronunciáveis tanto *in vitro* como *in vivo*.

Foi realizada a indução da pancreatite crônica alcoólica, em camundongos Swiss (*Mus musculus*) com peso variando de 25 a 30 gramas como o número de 20 animais por grupo, foram inicialmente testadas várias doses e intervalos de tempos para o modelo crônico proposto.

Assim com essas tentativas e erros, tentando avaliar as possíveis alterações locais e sistêmicas da administração do Álcool associado ao POA, foi determinado o seguinte protocolo, dividido em dois períodos (figura 1):

- (A) Protocolo de pancreatite aguda alcoólica:** Com a aplicação de álcool (1,35 g/Kg) associado ao ácido palmitoleico (POA) na dose de 150 mg/Kg (Dia 0), para o grupo controle foi aplicado um volume de 300µl solução salina 0,9%.
- (B) Protocolo de pancreatite crônica alcoólica:** Foi utilizada a mesma dose inicial de álcool (1,35 g/Kg) associado ao ácido palmitoleico (POA) (dia 0), porém foi realizada uma segunda aplicação com dose de 75mg/kg (7º dia) e a última aplicação com a dose de 37,5 mg/kg (14º dia), para o grupo controle foi aplicado um volume de 300µl solução salina 0,9%.

Os animais foram divididos em grupos controle e grupo Álcool/POA, sendo eutanasiados nos dias 1, 21, 29 e 44, assim foram retirados para avaliações, o pâncreas, sangue e fezes, além disto, foi avaliar o limiar nociceptivo.

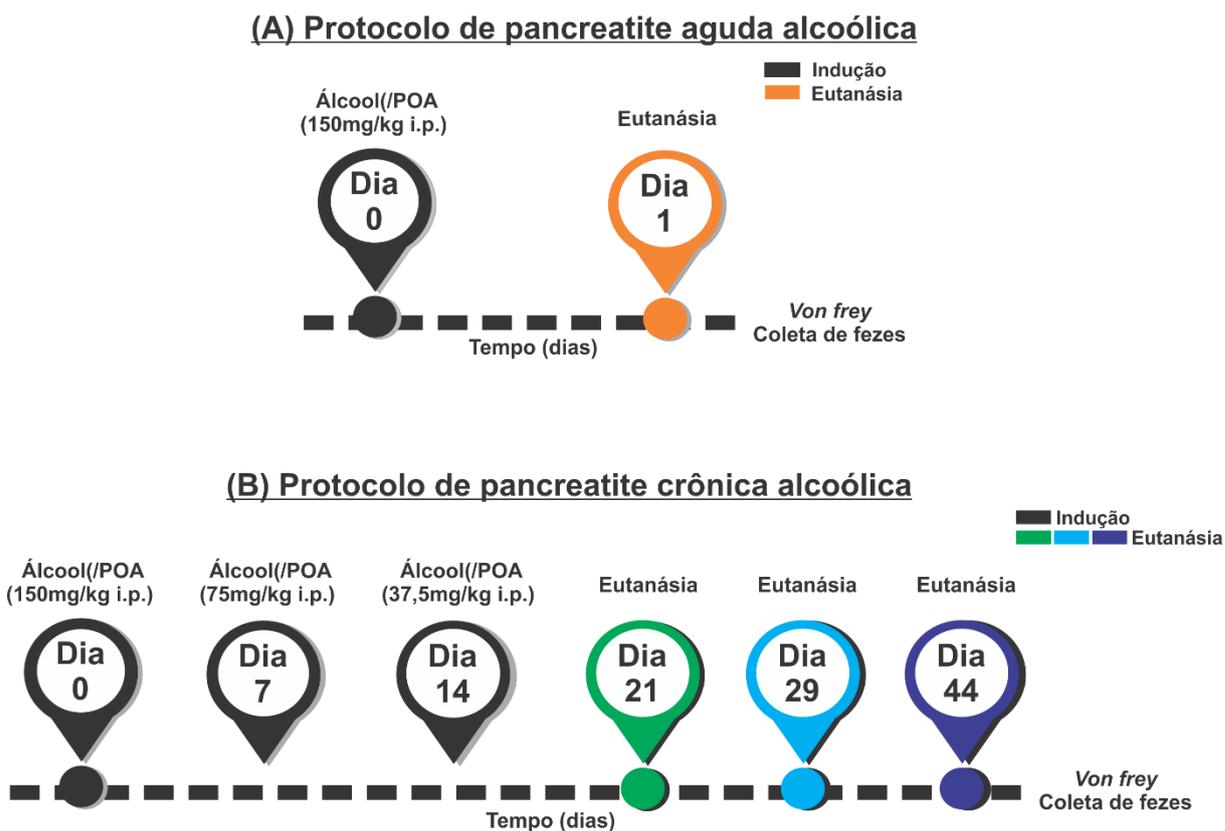


Figura 1 - Protocolo experimental para indução da pancreatite aguda e crônica alcoólica. Na imagem A podemos verificar a indução do processo agudo e B o protocolo de indução do processo crônico. O processo de indução foi realizado com o uso de aplicações de álcool (1,35 g/Kg) associado ao ácido palmítico (POA) na dose de 150 mg/Kg, foram também realizadas aplicações com doses menores de Álcool/POA, nas concentrações de 75mg/kg e 37,5 mg/kg.

4.3 Análise da sobrevida dos animais no protocolo de indução da pancreatite crônica

Para avaliar se a indução da pancreatite crônica com a associação do Álcool e o POA, buscou-se traçar o perfil de sobrevida destes animais. Na análise de sobrevida da pancreatite crônica, os parâmetros utilizados foram os coletados referentes a morte dos animais durante os dias 0, 1, 21, 29, e 44.

Ao final do processo de indução da pancreatite crônica alcoólica, foi possível ter um número de 10 animais por grupo Álcool/POA, possibilitando as análises pertinentes ao estudo, utilizando a linhagem de animais camundongos Swiss (*Mus musculus*). Os valores de sobrevida foram representados em percentual de pelo teste Kaplan-Meier comparando a sobrevivência pelo teste log-rank, $n= 6$ a 10 $p<0,001$.

4.4 Análise Histopatológica do pâncreas através da coloração hematoxilina e eosina

O pâncreas foi posto em parafina por métodos padronizados, cortados em seções de 4 μm por meio de um micrótomo e, posteriormente, os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE). As alterações morfológicas e características de pancreatite crônica foram adaptadas a partir do trabalho de Dewitt e colaboradores (2005), foram atribuído escores de 0 a 3 para as seguintes alterações: Atrofia glandular, fibrose periductal/interlobular e intralobular e por fim infiltrado de células mononucleares. As análises foram feitas com o auxílio de um microscópio ótico acoplado ao sistema de aquisição de imagens *Motic images plus 2.0* no aumento de 40x, os cortes foram analisados por um histopatologista que não conhecia as divisões dos grupos, tratamentos e tempos.

4.5 Análise Histopatológica de fibrose pancreática através da coloração de *Picrosirius red*

A quantificação de fibrose foi realizada pelo mesmo trabalho de Dewitt e colaboradores (2005). Essa coloração se faz por meio de um corante, o *Picrosirius red* (PUCHTLER, H. et al., 1973; JUNQUEIRA, L.C. et al., 1979), foram feitas alteração no protocolo, com o uso do kit disponível no momento (*EsayPathEP-11-20011*).

Para o método, os cortes de tecidos pancreático foram fixados em parafina, secadas, hidratados em álcool 100%, 95% e 70% e lavados em água corrente. Os núcleos foram corados com hematoxilina de Carazzi por 3 minutos e, em seguida, lavados por 10 minutos em água corrente. Foi utilizado nos cortes o corante *picrosirius red* por 5 minutos as lâminas foram lavadas duas vezes em uma solução aquosa contendo ácido acético à 1% por 5 minutos. Posteriormente foi removido fisicamente a maior parte da água das lâminas com agitação vigorosa. Para finalizar o protocolo, os tecidos passaram por 3 vezes em etanol 100% para desidratação, sendo limpo com xilol e montada com lamínula.

Os tecidos foram distinguidos do fundo de acordo a uma diferença na densidade da luz. A quantidade de colágeno (corada em vermelho) também foi medida com o auxílio de um microscópio ótico acoplado ao sistema de aquisição de imagens *Motic images plus 2.0* no aumento de 40x. os cortes foram analisados por um histopatologista que não conhecia as divisões dos grupos, tratamentos e tempos.

4.6 Determinação da atividade de enzima mieloperoxidase (MPO)

Amostras de pâncreas foram coletadas, pesadas e maceradas em 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB, Sigma Aldrich, EUA), pH 6,0, na proporção de 500 µL de solução para 50 mg de tecido. Posteriormente, o macerado foi centrifugado (5000 rpm, 7 min, 4°C). Em seguida, 10 µL do sobrenadante foram colocados em placa de 96 poços em duplicata. Em cada poço, adicionaram-se 200 µL de solução contendo O-dianisidina (Sigma Aldrich, EUA), 5 mg diluída em 3 mL tampão fosfato. A essa solução foram ainda adicionados 15 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, Sigma Aldrich, EUA) a 1%.

Determinou-se a absorbância em leitor de absorbância (BMG Labtech, Espanha) no comprimento de onda de 450 nm. Foi realizada leitura no tempo zero e após 1 minuto. Os resultados foram expressos em unidades de MPO/mg de tecido. Uma unidade de MPO será definida como a quantidade capaz de converter 1 µmol de peróxido de hidrogênio a água em 1 min a 22°C (BRADLEY et al., 1982).

4.7 Determinação dos níveis séricos de α-Análises, lipase e glicose

A realização das análises colorimétrica de α-Análises, lipase e glicose foram realizadas a partir do sangue recolhido dos animais, seguiram as recomendações propostas pelos *kits* da InterKit para α-Análises, Bioclin para lipase e

Labtest referência 133-1/500 para medições da Glicose pós-prandial. As aquisições dos dados foram realizadas no fluorímetro *Fluorstar Optima*.

4.8 Determinação da atividade de Tripsina pancreática

A atividade de tripsina foi realizada de acordo com o trabalho de Hunag W e colaboradores (2014), o preparo das amostras de pâncreas foi feito em tampão de homogeneização pH 6,5, (contendo MOPS 5 mM, sacarose 250 mM e sulfato de magnésio 1 mM), foram centrifugados a 1.500 g por 5 min e 15 µL do sobrenadante foi adicionado a uma microplaca de 96 poços. Em seguida foi adicionado o substrato de tripsina (Boc-Gln-Ala-Arg-MCA- Sigma, EUA) (contendo tampão pH 8,0, contendo Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 1 mM e 0,1 mg / mL de albumina de soro bovino). A concentração final de trabalho para o substrato foi 50 µM. A mistura (285 µl) foi adicionada as amostras permitindo a clivagem da tripsina pelo substrato, tendo volume final 300 µl.

A detecção de atividade de tripsina foi realizada no espectrofotômetro *Fluorstar Optima*, no modo de leitura cinético, sendo assim as amostras foram excitadas a 380 nm e as emissões coletadas em 440 nm durante 5 minutos. A curva padrão foi gerada usando tripsina porcina (Sigma, EUA) em diferentes concentrações (0 - 150 µM).

A atividade enzimática foi calculada a partir da regressão linear das absorbâncias das concentrações da curva de tripsina em diferentes concentrações (0 - 150 µM) e a absorbância das amostras.

4.9 Avaliação de esteatorreia nas fezes dos animais após a indução da pancreatite crônica

O teste de Sudam III é útil no diagnóstico da esteatorreia, é um exame qualitativo de gorduras nas fezes. O método de Sudam III (benzeno-zobenzonazobetanaftol) foi introduzido em técnica histológica. A quantidade de 1 grama do corante é dissolvida em 100 ml de uma solução contendo uma parte álcool 70% e uma parte de acetona pura para análise (P.A). As fezes dos animais foram coletadas nos dias: 0, 1, 21, 29 e 44.

Foi realizado um homogenato das fezes junto ao corante previamente diluído, e em seguida foi montado em uma lamina de histologia e feitas as leituras de 10 campos na objetiva com aumento de 40x, posteriormente a leitura destas lâminas,

foram dados os seguintes escores: de 5 a 20 eventos (1 escore), de 21 a 50 eventos (2 escores) e maior do que 50 eventos (3 escores), os escores foram adaptados de acordo com o trabalho de Neves, D.P. e colaboradores (2010).

4.10 Teste de hiperalgesia visceral mecânica abdominal (*VonFrey*)

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

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

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

Foram realizadas três aplicações distintas para cada animal, sendo realizada as médias entre esses valores. Também foram realizados as médias das respostas basais sem a aplicação de estímulos em variados tempos após a indução da pancreatite.

4.11 *Western blotting* para α - actina de Músculo liso (α -SMA)

Amostras de pâncreas foram submetidas à sonicação com solução de lise celular (Triton X-100 1% e Nonidet P-40 0.2%) e EDTA (2mM), sendo transferidas posteriormente para tubos de 2ml (marca eppendorf), e centrifugadas a 14000 rpm a 4°C. A concentração proteica do sobrenadante foi determinada pelo *KitBCA – bicinchoninic acid*, em tubos *eppendorf*, com leitura em espectrofotômetro (absorbância de 562nm). Foi padronizada a quantidade presentes de proteína para 50µg/mg de tecido, de acordo com uma curva padrão para proteína de acordo com o *kit*. Os lisados foram congelados a - 80° C até a análise.

Em seguida, foi realizada a separação eletroforética (*Bio Rad mini-gel*) das amostras após desnaturação (por meio de ebulição) em gel de poliacrilamida 12,5% (*SDS - Page*), com o marcador de proteína (*Invitrogen*). O gel foi então transferido para uma membrana de *PVDF* em aparelho de transferência 100V (*Bio Rad mini-transfercell*) durante 60 min a 4° C. Em seguida a membrana foi bloqueada com Albumina bovina (BAS) à 5% por 1 hora, a fim de bloquear outras proteases, seguida de incubação com anticorpo primário α -SMA (diluição 1:200, Sigam Aldrich) e p38 (diluição 1:200 Santa Cruz) *overnight*.

No dia seguinte após lavagens com tampão, foi feita incubação com anticorpo secundário anti-mouse provenientes da Santa cruz e anti-Rabbit (*Invitrogen*), diluído 1:2500, durante 1 hora, em plataforma oscilante. Posteriormente, foi feita a revelação da membrana pela técnica de *ECL*, com ajuda de um *Chemi doc* (*BioRad*) com posterior leitura e o diagnóstico da densidade das bandas por meio do programa *Image lab* da *BioRad*.

4.12 Determinação do teor de Hidroxiprolina

O teor de hidroxiprolina foi determinado a partir do protocolo elaborado por Woessner e colaboradores (1961) e modificado por Gomez e colaboradores (2004). O protocolo foi iniciado com o preparo das amostras, na proporção de 10 mg da do tecido para cada 100 µl de água *Mille Q*. As amostras foram diluídas na proporção de 1:1, sendo retirado um volume final de 100 µl do e misturado com 100 µl de ácido clorídrico (HCL) a 12N e deixadas na temperatura de 120 ° C por 1 h, para formação do hidrolisado. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 3 minutos e foi coletado 50µl do sobrenadante, adicionados em uma placa de 96. A reação foi iniciada com a adição de 100 µl da solução de Cloramina T (SIGMA - EUA referência 402869) em todos os poços respeitando o tempo de espera de 5 minutos em temperatura ambiente, posteriormente foi adicionado 100 µl do Reagente Ehrlich em todos os poços e incubado por 90 minutos a 60° C em banho-maria e realizada a leitura de absorbância a 560 nm.

A determinação da concentração de hidroxiprolina nas amostras foi realizada a partir da regressão linear dos valores de absorbância curva padrão de hidroxiprolina (SIGMA - EUA referência H54409) nas concentrações de 6 a 0,2 mmol.

4.13 Análise Estatística

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

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

5. RESULTADOS

5.1 A pancreatite crônica resulta na mortalidade acentuada

Como visto, para investigar a letalidade da indução da pancreatite crônica, no modelo experimental, os dados coletados foram os óbitos, nos dias 0, 1, 21, 29 e 44, assim foi possível quantificar a probabilidade de sobrevivência no modelo de pancreatite crônica alcoólica, por meio de uma curva de sobrevivência.

Observamos que no grupo controle, que receberam apenas solução controle, tiveram uma sobrevivência de 100%, porém foi observado um perfil diferente nos animais dos grupos Álcool/POA.

Os resultados mostram que durante o processo da pancreatite foram obtidos os seguintes dados de sobrevivência: Para os animais do período agudo referente ao grupo Álcool/POA 1 observa-se uma sobrevivência de 80,19 %. Durante o período de indução iniciado no dia 0 até o 14º dia, observou-se que no 7º dia a sobrevivência foi de 75,48 %, no 14º dia foram 65,41 %. O resultado apresentado no 21º dia, mostram uma sobrevivência de 63,99 %, no 29º dia obteve-se 58,66 % e por fim no 44º dia, referente ao último dia experimental, apresentou-se uma sobrevivência de 53,77 %, a sobrevivência média foi de 58,80% (Gráfico 1).

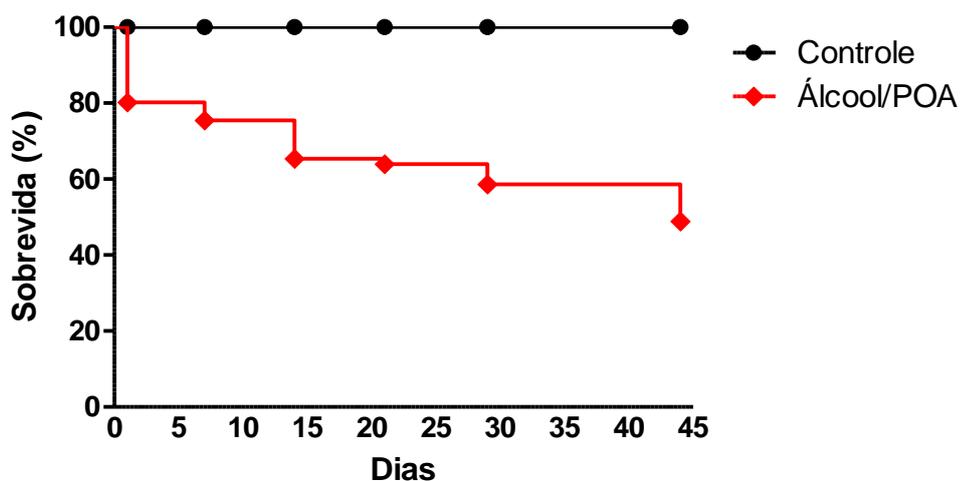


Gráfico 1 - Pancreatite crônica resulta na mortalidade acentuada. Representação gráfica da curva de sobrevivência dos grupos controle e Álcool/POA, observa-se a sobrevivência do processo de indução da pancreatite crônica durante o período experimental referentes aos dias 0, 1, 7, 14, 21, 29 e 44. Os valores de sobrevivência foram representados em percentual de pelo teste Kaplan-Meier comparando a sobrevivência pelo teste log-rank, $n=10$ $p<0,001$.

5.2 O processo de pancreatite crônica promove alterações no tecido pancreático como: infiltrado mononuclear e polimorfonucleares e atrofia glandular

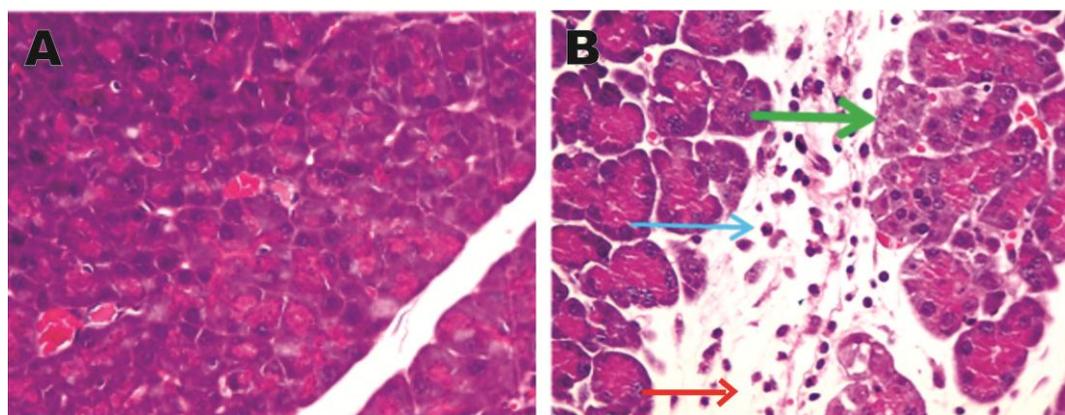
Diante a obtenção e análises das imagens, verificou-se que não houve alterações morfológicas tendo a preservação das estruturas como; células acinares e ilhotas de Langerhans, tanto para o grupo controlado processo agudo e crônico (Figura 2A e figura 2C respectivamente).

A observação das lâminas no processo agudo grupo Álcool/POA 1 dia, podemos verificar a presença de: infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares (seta azul), edema (seta vermelha) e necrose (seta verde) na figura 2 B.

Porém os achados histopatológicos que evidenciam importantes e severas alterações no tecido pancreático foram encontrados nos grupos Álcool/POA decorrentes do período mais tardio. Observa-se que nos grupos Álcool/POA 21, 29 e 44 dias (Figura 2D; 2E; 2F respectivamente), a presença de alterações acentuadas na morfologia do pâncreas como: perda de células acinares (seta vermelha), a presença de tecido fibroso (seta preta) e o infiltrado de células mononucleares (seta azul).

Podemos observar que a indução da pancreatite crônica alcoólica conferido nos períodos de tempo 21, 29 e 44 dias, proporcionam perdas de estruturas morfológicas importantes ao tecido pancreático, podendo ser correlacionadas as condições encontradas na clínica, essas alterações por sua vez, podendo culminar em perda de função do pâncreas.

Histologia da pancreatite aguda alcoólica



Histologia do protocolo de pancreatite crônica alcoólica

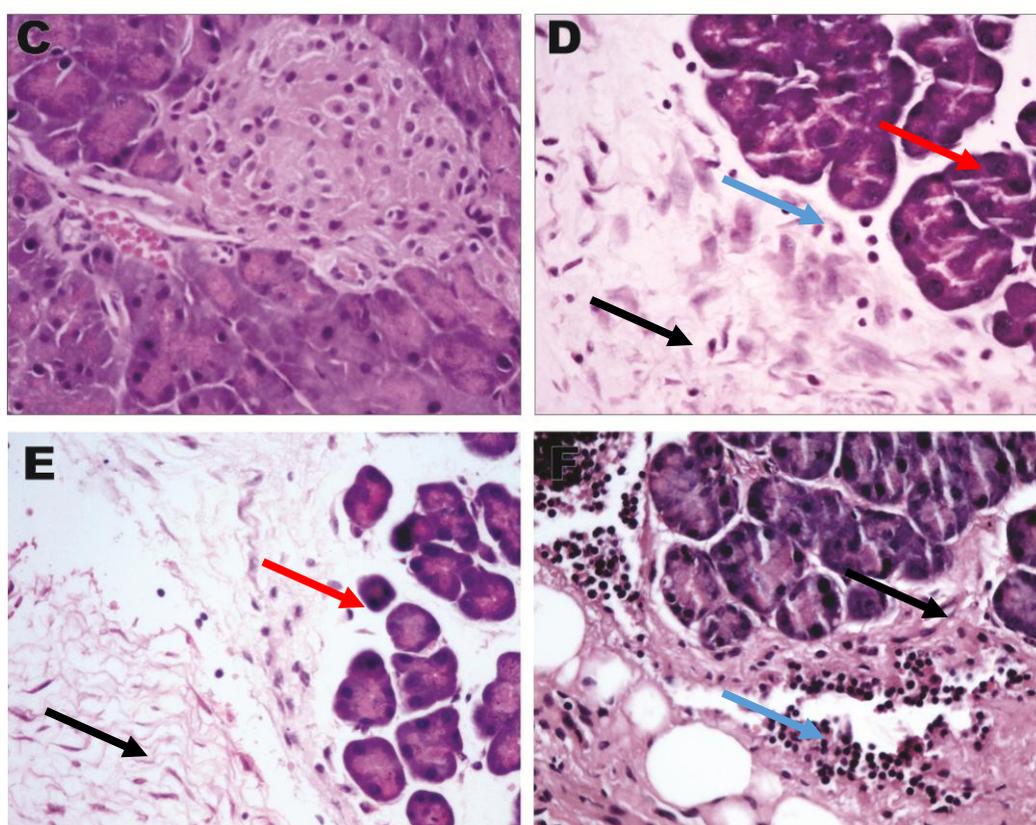


Figura 2 - Análise histopatológica do tecido pancreático:Integridade morfológica preservada nos grupos controles (A e C), alterações presentes no Álcool/POA 1 dia (B), alterações teciduais significativas nos grupos Álcool/POA 21,29 e 44 dias (D,E e F respectivamente). As setas pretas mostram fibrose, setas vermelhas atrofia de células acinares e seta azul o infiltrado de células monocelulares. Todas as lâminas foram avaliadas por um histopatologista com auxílio do programa *Motic images plus 2.0* (coloração de HE, com aumento 40x).

5.3 Presença de fibrose no processo de pancreatite crônica

Sendo a fibrose uma importante característica morfológica das inflamações crônicas, observou-se e quantificou-se essa atuação por meio da coloração por *Picrosirius red*.

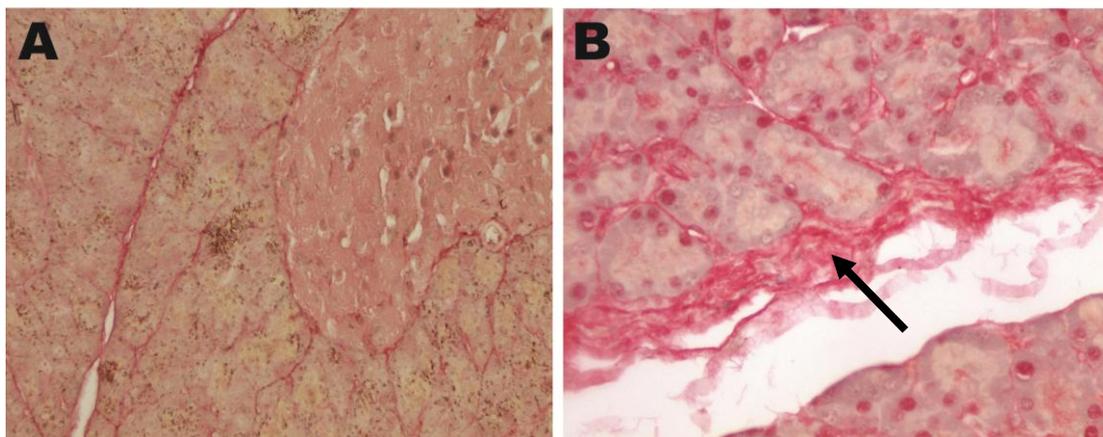
O pâncreas dos animais do grupo controle tanto do processo agudo como crônico, permanecem com as estruturas característica do um pâncreas normal, com: células acinares e ilhotas de Langerhans preservadas, sem alterações morfológicas (Figura 3A e 3C).

No processo agudo, foi observado nas lâminas do grupo Álcool/POA 1 dia, ainda permanecem a preservação de células acinares e ilhotas de *Langerhans*, porém já é possível observar a presença de fibrose no tecido (seta preta). Devido ao tempo de exposição do animal ao Álcool/POA, esta fibrose, não promove alterações severas ao tecido (Figura 3B).

Em contrapartida, as análises dos grupos Álcool/POA 21, 29 e 44 dias (Figuras 3D; 3E; 3F), já é possível evidenciar alterações morfológicas mais importantes e severas no pâncreas com uma presença significativa de fibrose nos tecidos (seta preta) em consequência desta alteração verifica-se a substituição do tecido normal do pâncreas levando a alterações na estrutura remodelado pela fibrose (seta azul), estando presente em grande parte do tecido.

Estas análises histopatológicas de fibrose é uma técnica histológica mais específica para demonstrar fibrose nos tecidos e o que podemos verificar é que ela está presente em grande quantidade nos grupos Álcool/POA nos tempos 21, 29 e 44 dias, apresentam uma grande modificação morfológica como perdas estruturais, assim como encontradas na clínica da pancreatite crônica.

***Picrosirius* pancreatite aguda alcoólica**



***Picrosirius* pancreatite crônica alcoólica**

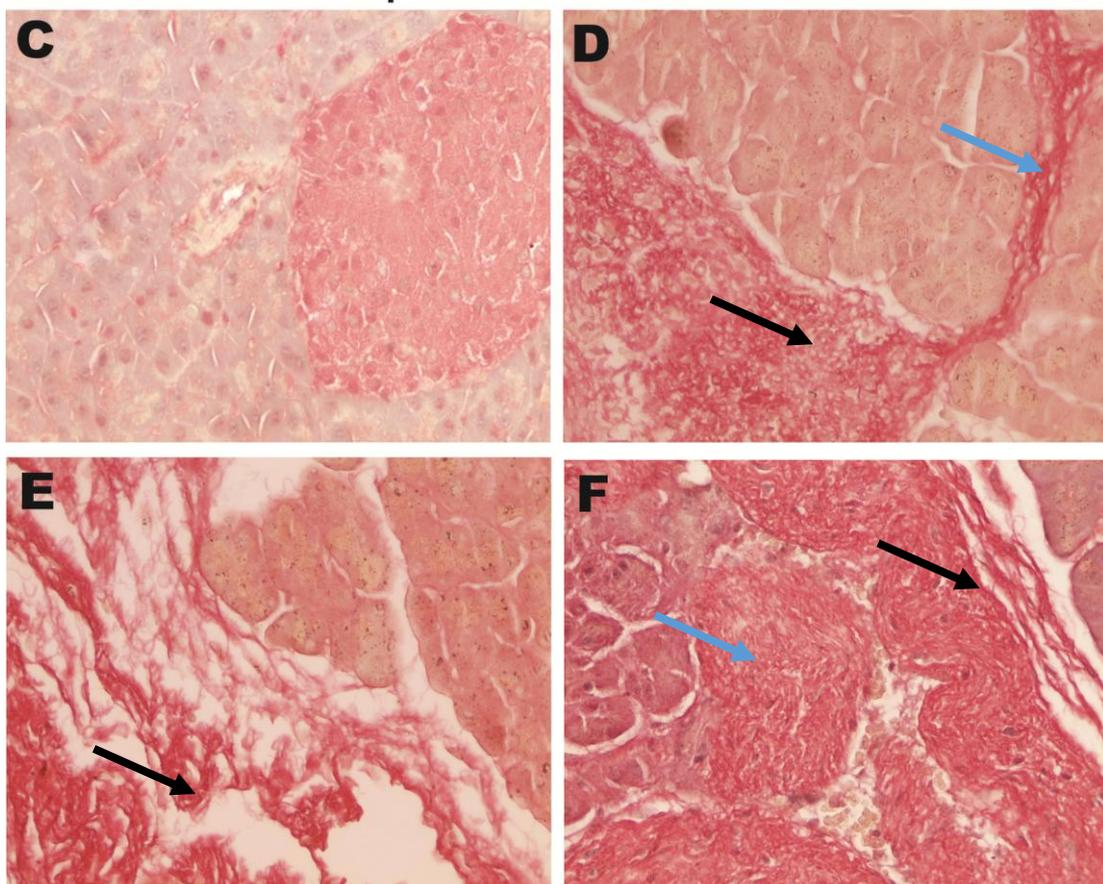


Figura 3 - Análise de fibrose pela coloração de *picrosiriusred*: Observa-se que no grupo controle não se encontram evidências de um processo fibrose em ambos os protocolos, porém observando um inícioda fibrose grupo álcool/POA 1 dia (B), e uma agravamento nos grupos álcool/POA 21, 29, e 44 dias (C, D e F) (setas pretas) (coloração de *picrosiriusred* com aumento 40x), seta azul alteração do tecido.

5.4 A pancreatite crônica promove atrofia glândular, presença de fibrose e infiltrado de células monocelulares

Para validação das alterações histopatológicas da pancreatite aguda e crônica, foram atribuídos escores, baseados e adaptados de acordo com o trabalho de Dewitt e colaboradores (2005) descritos na metodologia.

Os resultados analisados do grupo Álcool/POA 1 dia, apresentou presença das seguintes alterações: infiltrado de células polimorfonucleares com escores de $2,76 \pm 0,12$, edema $2,46 \pm 0,21$ e necrose $2,69 \pm 0,20$, sendo características de um processo inflamatório agudo (Figura 4A).

As alterações que evidenciam características de um processo crônico, foram observadas nos grupos Álcool/POA 21, 29 e 44 dias. Essas alterações morfológicas foram classificadas de três formas: atrofia glândular, infiltrados de células mononucleares e fibrose periductal e intralobular/interlobular.

A atrofia glândular foi observada no grupo Álcool/POA 21 dias, os valores foram de $1,68 \pm 0,22$, já para o grupo Álcool/POA 29 dias os escores foram $1,33 \pm 0,23$ e grupo Álcool/POA 44 dias $1,53 \pm 0,26$. Esses resultados evidenciam um aumento de atrofia glândular pancreática quando comparados ao seu grupo controle $0,48 \pm 0,09$ (Gráfico 2 B). A segunda característica foi a presença de infiltrados de células mononucleares, no grupo Álcool/POA 21 dias obteve-se os valores de escores $1,68 \pm 0,231$, grupo Álcool/POA 29 dias $0,86 \pm 0,27$ e o grupo Álcool/POA 44 dias os valores foram $1,25 \pm 0,21$. A presença de infiltrado de células mononucleares estão aumentadas significativamente quando comprado ao grupo controle $0,48 \pm 0,06$ (Gráfico 2 C). E por fim, foram observadas a última característica a presença de fibrose periductal, intralobular/interlobular, onde já para grupo controle tivemos a média de escores $0,14 \pm 0,09$, no grupo Álcool/POA 21 dias os valores foram de $1,86 \pm 0,22$, Álcool/POA 29 dias $1,06 \pm 0,28$ e o grupo Álcool/POA 44 dias $1,57 \pm 0,17$. (Gráfico 2 D). A presença de fibrose está significativamente aumentada em comparação ao grupo controle $0,48 \pm 0,06$.

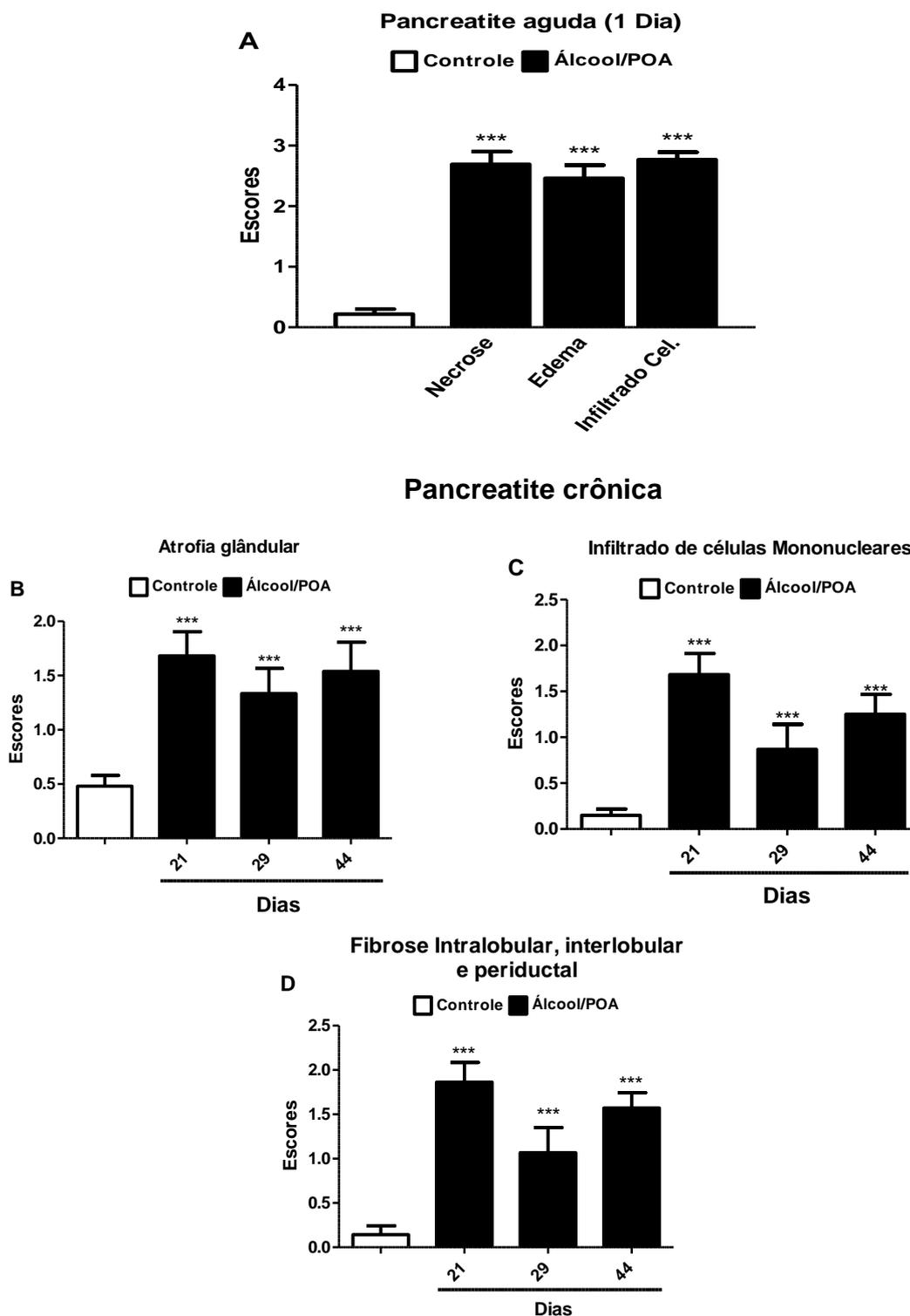


Gráfico2– Características morfológicas apresentadas na pancreatite. Pancreatite aguda apresentando necrose, edema e infiltrado de células polimorfonucleares (A). Atrofia glândular, células mononucleares e fibrose, presentes nos grupos Álcool/POA 21, 29 e 44 dias (B, C e D). Dados expressos com média \pm E.P.M. não paramétrico, teste T, seguido pelo teste *Kruskal Wallis*, $n = 10$. $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

5.5 Pancreatite crônica alcoólica experimental não cursa com o aumento da atividade de mieloperoxidase

A atividade de mieloperoxidase foi utilizada para verificar qual o perfil inflamatório do processo da pancreatite alcoólica aguda e crônica.

O processo inflamatório presente na pancreatite aguda referente ao grupo Álcool/POA 1 dia, esta coerente com a inflamação aguda, culminando com a presença de elevados níveis da atividade de MPO, com a média do valor de $101,61 \pm 12,14$ MPO (U/mg), em comparação ao seu grupo controle $29,69 \pm 4,01$ MPO (U/mg) (Gráfico 3 A).

Porém o que foi observado no processo de pancreatite crônica foi inverso. Os dados apontam que o perfil de inflamação crônica não tendo a participação da atividade de mieloperoxidase, possibilitando afirmar que as células encontradas nesse processo não são células polimorfonucleares.

Os dados apresentados no grupo Álcool/POA 21 dias relevou que a média dos valores foram $47,23 \pm 2,84$ MPO (U/mg), no grupo Álcool/POA 29 dias $36,12 \pm 5,79$ MPO (U/mg) e no grupo Álcool/POA 44 dias com valores de $32,46 \pm 9,90$ MPO (U/mg), observou-se que não houve diferença estatística entre o grupo controle com valor de $29,69 \pm 4,01$ MPO (U/mg) (Gráfico 3 B).

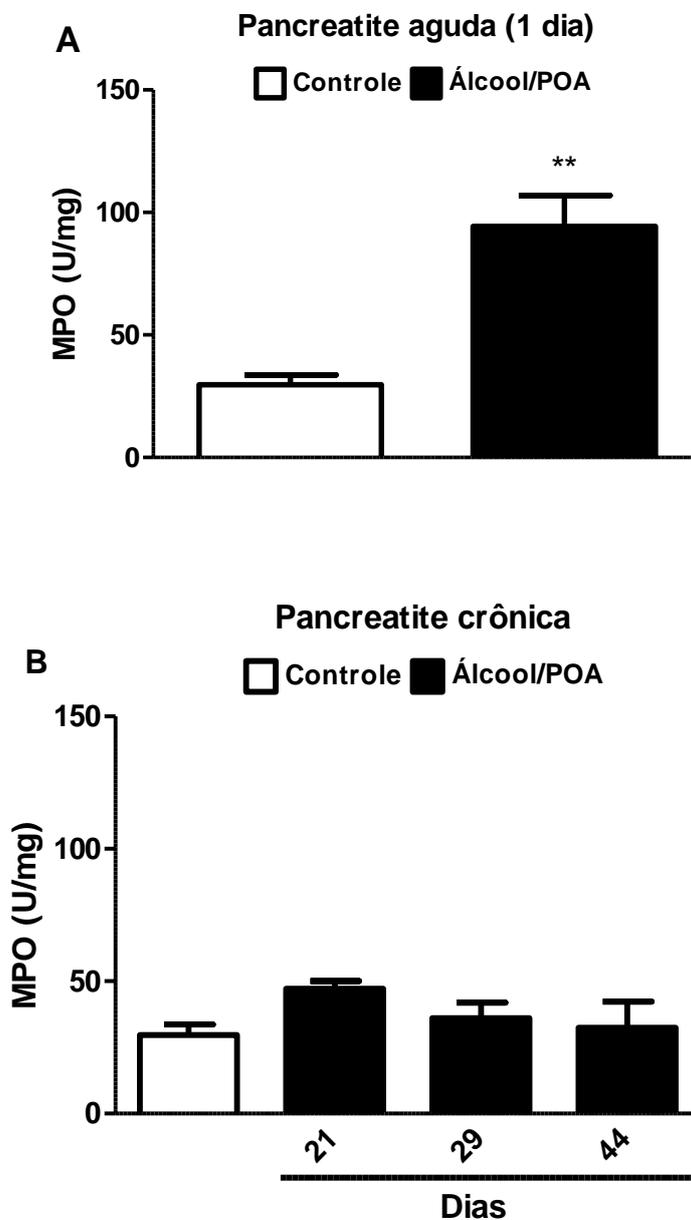


Gráfico3–Baixa atividade de mieloperoxidase em pancreatite crônica. A atividade de mieloperoxidase aumentada no grupo Álcool/POA 1 dia (A) e baixa atividade nos grupos Álcool/POA 21, 29 e 44 dias (B). Dados expressos com média \pm E.P.M. seguida da variância (ANOVA) seguido por teste de *Bonferroni* e teste T seguido por teste *Mann Whitney*, $n = 10$. $p < 0,05$ * quando comparado ao grupo controle.

5.6 Alterações dos níveis de α -amilase, lipase e atividade de tripsina na pancreatite crônica experimental alcoólica

Com base nas alterações encontradas na microscopia, buscou-se verificar se a mesma, poderia promover alguma alteração bioquímica durante o processo da pancreatite crônica diante aos danos apresentados. Para isso realizamos os testes colorimétricos de α -amilase, lipase e atividade de tripsina para avaliar a porção exógena, já para a avaliação a função endógena foi realizado a análise de glicose.

Verificou-se que grupo Álcool/POA 1 dias o valor médio de α -amilase teve um aumento significativo de $39,96 \pm 1,90$ (U/L), em relação ao controle $24,10 \pm 1,46$ (U/L) (Gráfico 4 A). Também foi evidenciado aumento nos níveis séricos de lipase de $4,21 \pm 0,14$ (UI/ml) e o grupo controle mostrou valores de $2,01 \pm 0,18$ (UI/ml) (Gráfico 4 B).

Já para os níveis de glicose pós-prandial, observa-se que a uma diminuição significativa de $4,21 \pm 0,14$ (UI/ml), comparado ao controle (Gráfico 4 C). Finalizando os resultados bioquímicos do grupo Álcool/POA 1 dias, realizou-se a investigação da atividade de tripsina, também foi observada um aumento significativo da atividade de $50,12 \pm 8,60$ (pmol/mg), comparado ao seu controle de $13,69 \pm 1,03$ (pmol/mg) (Gráfico 4 D).

Porém a grande dúvida era saber se a pancreatite crônica alcoólica após o processo de indução, poderia apresentar alterações nos parâmetros bioquímicos. Para responder esse perfil bioquímico, realizou-se as análises dos mesmos parâmetros (α -amilase, lipase, glicose e atividade de tripsina).

Os resultados encontrados de α -amilase referentes aos grupos Álcool/POA 21, 29 e 44 dias, não foi possível observar alterações em comparação ao controle (Gráfico 4E).

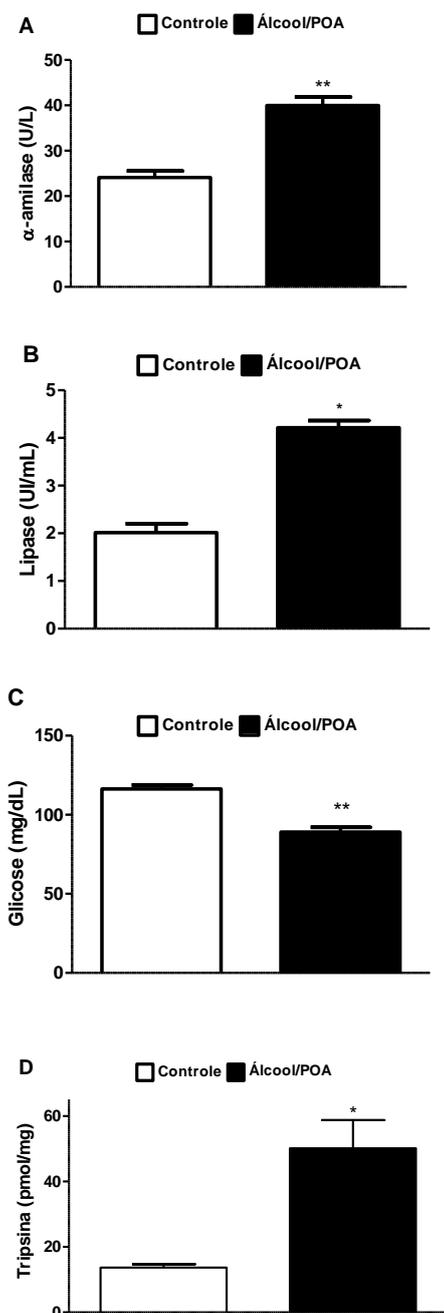
A alteração inicial foi observada no ensaio de lipase no grupo Álcool/POA 21 dias, observa-se os valores obtidos foram de $1,10 \pm 0,07$ (UI/ml), já para grupo Álcool/POA 29 dias os valores representados foram $1,35 \pm 0,05$ (UI/ml) e no grupo Álcool/POA 44 dias com valores de $1,42 \pm 0,04$ (UI/ml), a partir dos resultados obtidos desta análise, evidenciamos que houve uma diminuição significativa dos níveis de lipase comparados ao controle ($2,01 \pm 0,18$ UI/ml), Gráfico 4F.

A análise da glicose foi realizada no período pós-prandial, devido as condições debilitantes encontrada nos animais, não foi observado alteração na análise de glicose dos grupos Álcool/POA 21 e 29 dias. Porém a alteração no nível

de glicose foi evidenciada apenas no grupo Álcool/POA44 dias, com valores de $137,50 \pm 5,47$ (mg/DL) comparado ao grupo controle ($116,13 \pm 2,55$ mg/DL), gráfico 4 G.

E por fim, a atividade de tripsina (Gráfico 4 H), não foi evidenciada nos grupos Álcool/POA21, 29 e 44 dias.

Pancreatite aguda (1 dia)



Pancreatite crônica

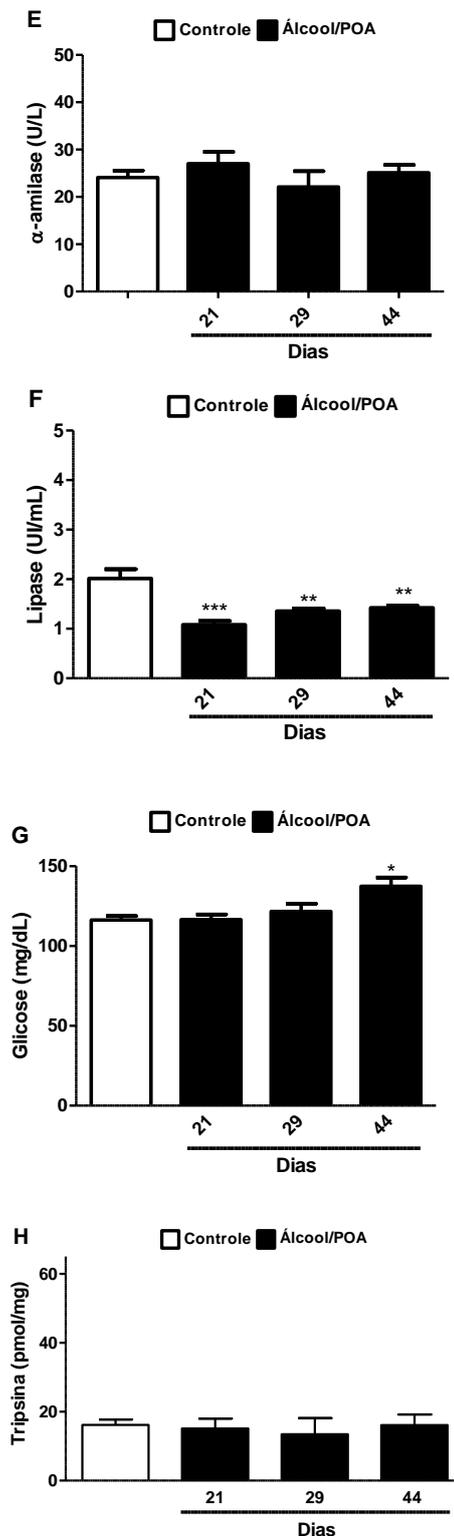


Gráfico 4—Alterações bioquímicas no curso da pancreatite. Pancreatite crônica, altera os níveis séricos de α -amilase, lipase, glicose e a atividade de tripsina. Nos dias 1, 21, 29 e 44 dias. Dados expressos com media \pm E.P.M. seguida da variância

(ANOVA) seguido por teste de *Bonferroni* e teste T seguido por teste *Mann Whitney*, $n = 10$. $p < 0,05$ * quando comparado ao grupo controle.

5.7 Aumento de esteatorreia na pancreatite crônica

O ensaio de Sudam III, foi utilizado para investigar a presença de gorduras nas fezes, devido a alteração observada no ensaio de lipase, atribuindo escores as células de gorduras encontradas nas fezes.

Observou-se que no grupo Álcool/POA 1 dia (Gráfico 5 A) não se teve presença significativa de gordura nas fezes, porém nos grupos Álcool/POA 21 ($2,53 \pm 0,14$) 29 ($2,42 \pm 0,17$) e 44 ($2,60 \pm 0,10$) dias, houve um aumento significativo da presença de gordura nas fezes dos animais, em comparado ao grupo controle ($1,89 \pm 0,09$) observados no gráfico 5 B.

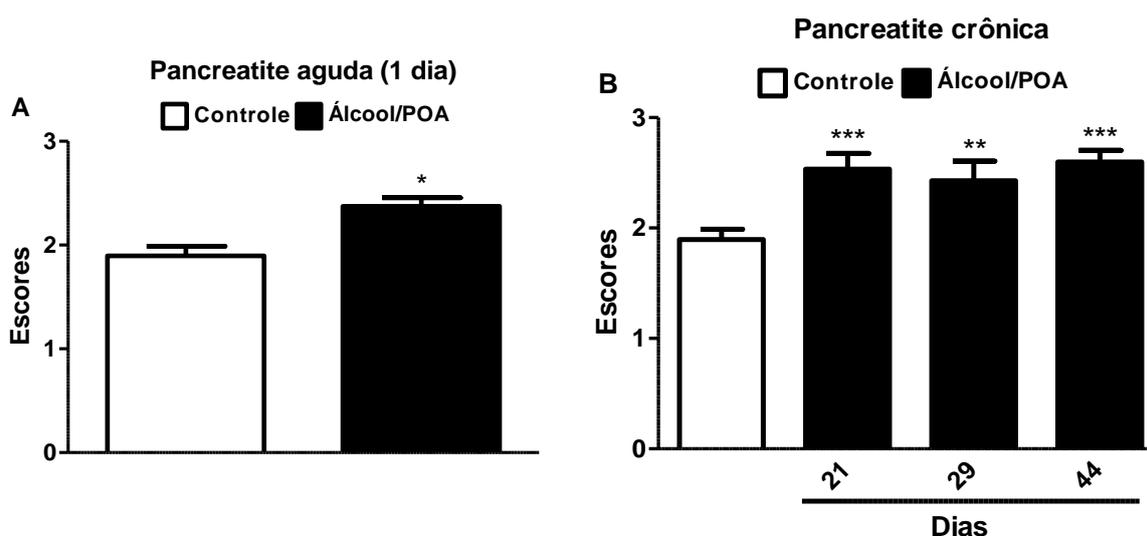


Gráfico 5 - Esteatorreia presente na pancreatite crônica. Sem gordura presente nas fezes dos animais do Álcool/POA 1 dia (A). Aumentos de gordura nas amostras dos grupos Álcool/POA 21, 29 e 44 dias (B), Dados expressos com média \pm E.P.M. seguida da variância (ANOVA) teste T seguido pelo teste *Kruskal Wallis*, $n = 10$. $p < 0,05$ * quando comparado ao grupo controle.

5.8 Hiperalgisia visceral presente no processo da pancreatite crônica

Uma das caracterizas da pancreatite crônica é a dor, podendo ser apresentada de forma intensa e intermitente, diminuindo a qualidade de vida dos indivíduos. Para investigação da hiperalgisia, realizou-se a mensuração dos limiares nociceptivos, através do *VonFrey*, aplicando uma pressão na região do abdômen superior dos animais, sendo coletado o valor em gramas.

No período de aguda (1 dia após a indução), pode ser evidenciado uma diminuição significativa do limiar nociceptivo, com a presença de uma hiperalgisia na região do abdômen superior no grupo Álcool/POA 1 dia, tendo valores de $4,21 \pm 0,39$ g, quando comparado a seu controle ($13,25 \pm 0,40$ g), gráfico 6 A.

A avaliação de limiar nociceptivo teve grande importância pois não era sabido qual o perfil de hiperalgisia dos animais no modelo de pancreatite crônica. Houve uma diminuição do limiar, para os animais do grupo Álcool/POA 21 dias, observou-se os valores de $4,12 \pm 0,70$ g e o seu grupo controle $13,12 \pm 0,56$ g, no grupo Álcool/POA 29 dias os valore do limiar foram de $4,62 \pm 0,83$ g e o grupo controle $13,20 \pm 0,52$ g e por fim os também foi verificado uma diminuição significativa no grupo Álcool/POA 44 dias com valores de $10,03 \pm 0,60$ g comparado ao controle ($13,09 \pm 0,54$ g), gráfico 6 B.

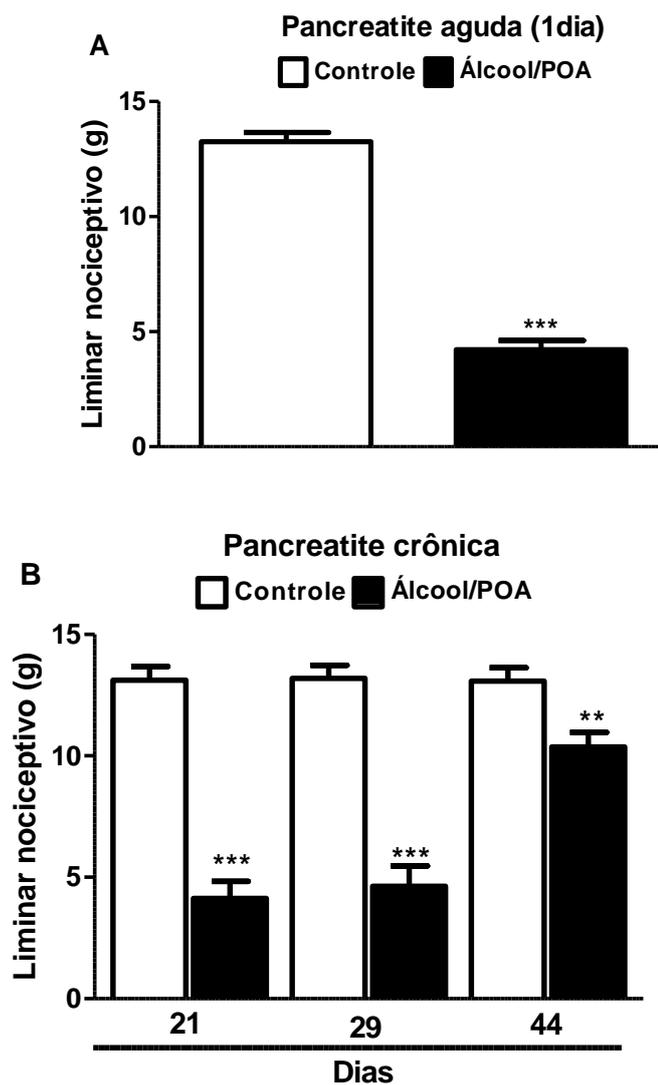


Gráfico6– Hiperalgesia visceral na pancreatite crônica. Hiperalgesia visceral presente nos animais do Álcool/POA 1 (A), assim como nos grupos Álcool/POA 21, 29 e 44 dias (B). Dados expressos com média \pm E.P.M. seguida da variância (ANOVA) seguido por teste de *Bonferroni* e teste T seguido por teste *Mann Whitney*, $n = 10$. $p < 0,05$ * quando comparado ao grupo controle.

5.9 A pancreatite crônica cursa com a expressão da Alfa Actina de musculo liso (α -SMA)no tecido pancreático

A participação das células estelares tem grande importância para a caracterização da pancreatite crônica, pois está participa do processo de fibrose. Para investigação da participação dessas células, foi realizada a expressão para a α -SMA. Em nosso trabalho podemos verificar que no grupo controle tivemos pouca expressão ($0,29 \pm 0,02$), porém quando comparamos aos grupos POA 1 dia ($0,23 \pm 0,04$), 21 dias ($0,789 \pm 0,10$), 29 dias ($0,64 \pm 0,08$) e 44 dias ($0,48 \pm 0,05$) dias, observamos que houve um aumento significativo a expressão de α -SMA, demonstrando que a uma participação das células estelares no processo de pancreatite crônica.

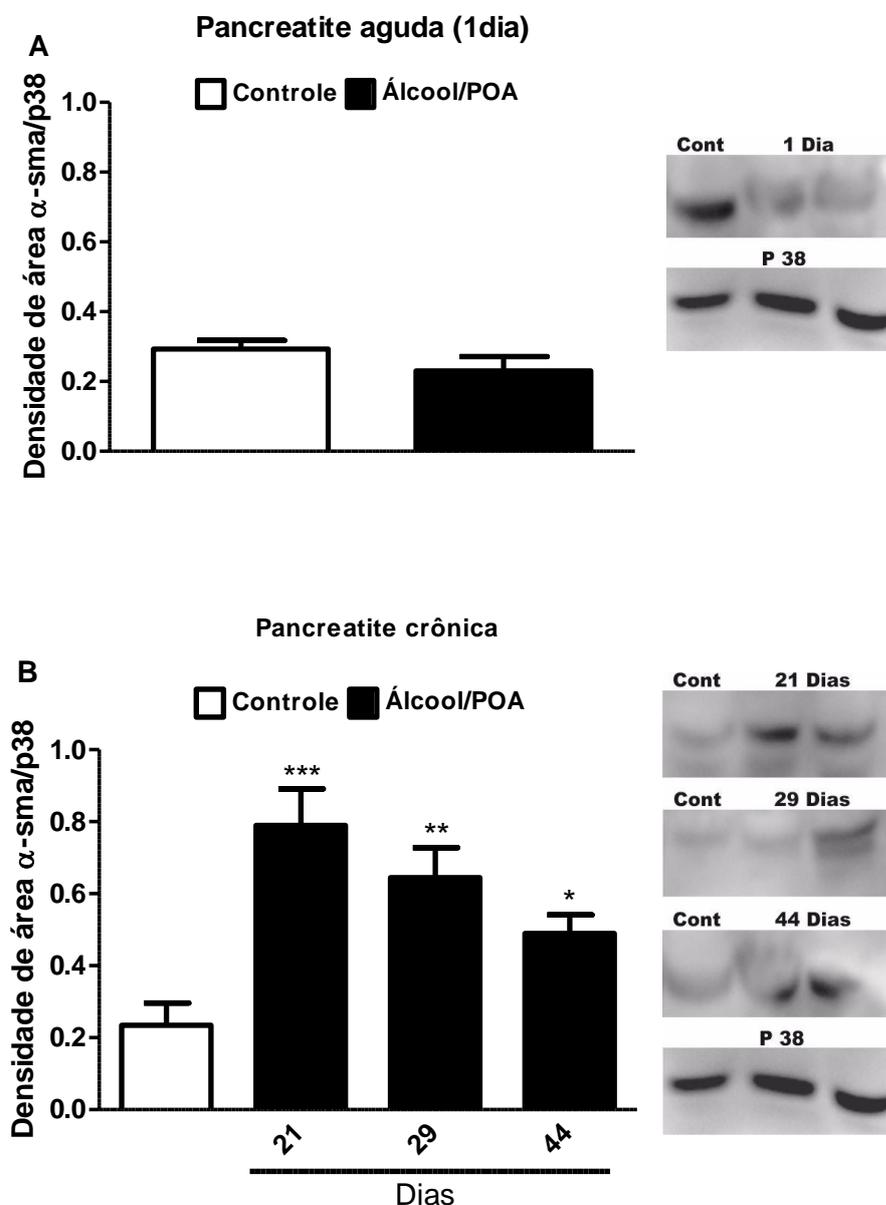


Gráfico7 – Aumento da expressão de α -SMA pelas células estelares na pancreatite crônica. A expressão de α -SMA na pancreatite crônica induzida pelo Álcool/POA, presente nos grupos Álcool/POA 21, 29, 44 dias (B), já para o grupo Álcool/POA 1 dia (A) não apresenta expressão significativa. Análises estatísticas de variância (ANOVA) não paramétrico, com média \pm E.P.M seguido pelo teste *Bonferroni*, $n = 6, p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

5.10 Aumento nos níveis de hidroxiprolinano desenvolvimento da pancreatite crônica

Hidroxiprolina é um componente restrito ao colágeno e um importante índice de metabolismo em muitos tecidos, a presença de hidroxiprolina reflete a deposição de colágeno na pancreatite crônica.

Para investigar a sua participação no modelo proposto, realizamos pela reação de oxidação hidroxiprolina com 4- (dimetilamino) benzaldeído (DMAB). No estudo, podemos verificar que não houve a presença significativa de hidroxiprolina no protocolo de pancreatite aguda, referente ao grupo POA 1 dia ($37,76 \pm 5,74$ mmol), comparado ao controle ($23,18 \pm 4,04$ mmol) gráfico 8 A.

Porém foi observado um aumento significativo de hidroxiprolina no grupo 29 dias ($138,04 \pm 23,32$ mmol) e 44 dias ($101,08 \pm 20,01$ mmol), quando comparado ao grupo controle ($23,18 \pm 4,04$ mmol) gráfico 8 B, demonstrando aumento na deposição de colágeno na pancreatite crônica.

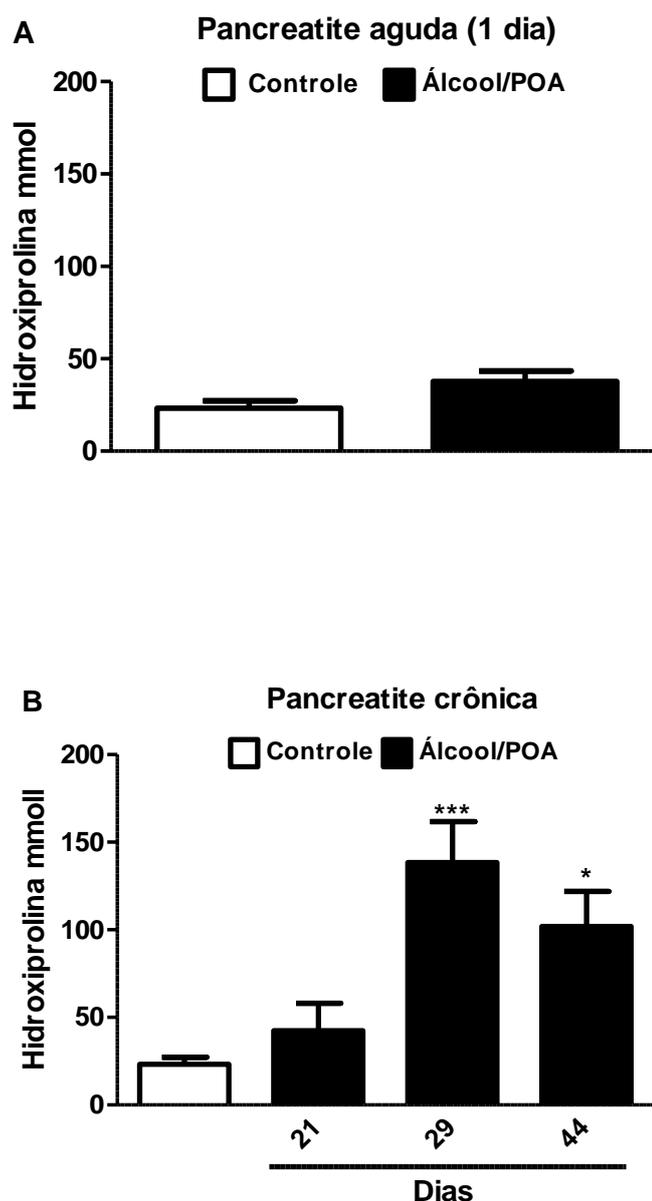


Gráfico 8 – Pancreatite crônica cursa com a deposição de colágeno no pâncreas. A presença de hidroxiprolina reflete a deposição de colágeno na pancreatite crônica induzida pelo Álcool/POA, presente nos grupos Álcool/POA 29 e 44 dias (B), já para o grupo Álcool/POA 1 dia (A) não apresenta expressão significativa. Análises estatísticas de variância (ANOVA) não paramétrico, com média \pm E.P.M seguido pelo teste *Bonferroni*, teste T seguido de *Mann Whitney*, $n = 10$, $p < 0,05$. comparado ao grupo controle.

6. DISCUSSÃO

Nosso modelo experimental proposto cursou com alterações importantes, características de um processo de cronificação do tecido pancreático. As alterações observadas foram mudanças e bioquímicas, bem como a presença de alterações nociceptivas.

Na literatura há trabalhos que desenvolveram modelos de pancreatite crônica por diferentes técnicas, dentre elas, o uso de dietas ricas em gordura, aplicações sucessivas de ceruleína, álcool, obstrução ductal e animais geneticamente modificados (SAH, R.P. et al., 2013; NEUSCHWANDER-TETRI B.A. et al., 2000; VONLAUFEN A. et al., 2007; MARRACHE F. et al., 2008).

Yamamoto, M. e colaboradores (2006), induziu uma hipertensão ductal para o desenvolvimento da pancreatite crônica através do Ácido Sulfônico Trinitrobenzeno (TNBS), verificando que os ductos pancreáticos estavam levemente dilatados com presença de fibrose acentuada em áreas interlobulares e intralobulares, além disto são evidenciadas reduções rápidas de bicarbonato e a estimulação de secreção de proteínas como a secretina além da formação de proteínas intraductais aumentando a inflamação crônica e a fibrose ao longo de 2 semanas.

Os modelos que utilizam a ceruleína, em camundongos e ratos, podem levar a pancreatite crônica, derivando-se de sucessivo processo de pancreatite aguda (NEUSCHWANDER-TETRI, B.A. et al., 2000). O uso da ceruleína possibilita o aumento da secreção de enzimas proteolíticas pancreáticas, é capaz de causar autólise das células acinares (SU et al., 2006). A aplicação de ceruleína pode causar a PC, porém as características de cronificação regredem quando as injeções são interrompidas, evidenciando este modelo tem desvantagens para o desenvolvimento da PC (WATANABE, T. et al., 2009). Além disso, o uso da ceruleína para o desenvolvimento da pancreatite crônica, necessita de 10 semanas, sendo a esse longo tempo uma desvantagem. São indicativos de PC o aumento de células inflamatórias e deposição de colágeno (SAH, R.P. et al., 2013).

O uso das modificações genéticas, também são empregadas para produzir vários modelos de pancreatite crônica, como por exemplo, a deleção dos genes que codificam o Regulador da Condutância Transmembrana da Fibrose Cística (CFTR) em ratos, sendo observada uma pancreatite leve, porém para o desenvolvimento de cronificação neste modelo, relatou a necessidade da aplicação de ceruleína (DIMAGNO M.J. et al., 2005). Outro modelo que também se fundamenta em

alterações genéticas consiste na utilização de ratos transgênicos para o gene IL-1 (mediador presente em alguns modelos de PC), a expressão de IL-1 nos ratos com 20 semanas de vida, promoviam a fibrose e uma resposta inflamatória com a predominância de células T, porém não apresentavam alterações morfológicas que culminassem no desenvolvimento de uma insuficiência pancreática exócrina e endócrina (MARRACHE F. et al., 2008).

Em modelos que combinam o álcool e lipopolissacarídeo (LPS), observou-se a ativação de receptores do tipo Toll 4 e CD14. Posteriormente foi observado a administração do álcool ativava as células estelares, mostrando a presença de fibrose, contudo, o processo de cicatrização aconteceu logo após a descontinuação do álcool (VONLAUFEN A. et al., 2007; VONLAUFEN A. et al., 2011).

A maioria dos mecanismos responsáveis no desenvolvimento da pancreatite crônica, está associada a sucessivas lesões teciduais. Portanto um modelo promissor, utilizando camundongos *Black* da linhagem C57BL para o desenvolvimento da pancreatite aguda, baseia-se na ativação de metabólitos da via não-oxidativa do álcool associado a ácidos graxos denominado ácido palmítico (POA), esse estudo mostra indicativos de alterações dos marcadores bioquímicos (tripsina, amilase e mieloperoxidase), aumento da citocina IL-6 e um desequilíbrio do cálcio citosólico nas células acinares, levando a um dano mitocondrial, decorrente da diminuição do aporte de Trifosfato de Adenosina (ATP), levando a morte celular e consequentemente ao dano tecidual (HUANG et al., 2014).

O estudo de Huang W. e colaboradores (2014) serviu como base para o desenvolvimento do processo crônico, sabendo que, a pancreatite aguda apresentada, em geral, é uma doença autolimitada. Portanto, partiu-se da ideia na qual a manutenção do estímulo nocivo por um período de tempo mais longo de indução, poderia proporcionar alterações importantes tanto morfológicas como endócrina e exócrina do tecido pancreático.

Como visto, são diversos os estudos propostos para o desenvolvimento da PC, porém no modelo analisado, pôde ser verificado que, para o curso da pancreatite crônica, a combinação do álcool e POA, culminam com um grande dano ao tecido pancreático, mimetizando as condições do processo patológico crônico em humano, que possui associação com uso abusivo do álcool, ácidos graxos e o tabagismo. As observações destas alterações presentes no trabalho são refletidas inicialmente nos achados histopatológicos, onde podemos verificar que a estrutura do tecido

pancreático dos animais submetidos a aplicação do álcool e POA, apresentaram atrofia glandular, fibrose e a presença de células mononucleares, evidenciando um processo de cronificação com baixa atividade de mieloperoxidase, e a presença de parâmetros irreversíveis como a atrofia glandular e fibrose.

Esses dados são correlacionados a pancreatite crônica, que por sua vez possui características de um processo inflamatório crônico e progressivo, podendo levar alterações irreversíveis do pâncreas, sendo substituído por tecido fibroso levando a perda da função. Esta perda irreversível do tecido, é descrita como uma alteração encontrada na clínica em indivíduos com a pancreatite crônica após episódios recorrentes de um processo de pancreatite aguda (MARIANI, A. et al., 2008).

As lesões recorrentes e sustentadas, devido ao uso abusivo de álcool, ácidos graxos e tabagismo são um ciclo em que observa-se inflamação e resolução. Este ciclo mostra a presença infiltrado de células mononucleares e de forma mais tardia, a presença de fibrose que condiciona à perda de células acinares e ilhotas de *Langerhans*, culminando nas alterações teciduais e/ou perda função do pâncreas (WHITCOMB D. C. et al., 2016). Os recorrentes episódios de lesões, evocam um estado irreversível devido a substituição do tecido normal pelo tecido fibrose, e essas causas primárias podem ser associadas com o desenvolvimento do câncer pancreático (HOUBRACKEN, I. et al., 2011).

As mudanças morfológicas encontradas no presente estudo refletiram na função do pâncreas, como as evidências na diminuição dos níveis séricos de lipase, tripsina e aumento da glicose pós-prandial. A importância desses achados, foram descritos no trabalho de Bornma e colaboradores (2003), ressaltam que as alterações estruturais, promovem a perda funcional com prejuízo na parte endócrina (causando *Diabetes Mellitus*) ou exócrina resultando em deficiência de amilase, lipase, e perda de peso. Na maioria dos pacientes, existe uma correlação entre a extensão das alterações morfológicas e redução da função pancreática exócrina (LOHR, J. M. et al., 2017).

Um estudo retrospectivo da função pancreática entre anos de 1989 e 1999, utilizando 103 pacientes e dentre eles alguns foram classificados com a pancreatite crônica pelo uso abusivo do álcool, mostrou que a morfologia e função exócrina, se correlacionam a pancreatite induzida por álcool. (MAARTENSE S. et al., 2004).

Um estudo de revisão bibliográfica, mostrou que a partir das informações fornecidas pelos pacientes com pancreatite crônica, utilizando-se de um instrumento de coleta dados com os relatos dos mesmos, resultou na observação de sintomas referentes aos impactos da insuficiência pancreática exócrina, como a redução da secreção enzimática, sendo esta, insuficiente para manter uma digestão normal de nutrientes, tendo como consequência, cólicas abdominais, inchaço, flatulência, esteatorreia e desnutrição (JOHNSON C. D. et al., 2017).

No estudo de Yamamoto, M. e colaboradores (2006), utilizando a aplicação de TNBS para obstrução do ducto pancreático, observou-se que não houve alteração no peso dos animais e nem na ingestão de alimentos, porém foi observado aumento dos níveis séricos de amilase, durante o período de agudo (24 h) e a lipase quando recolhida do suco pancreático, permaneceu com níveis baixos durante o período experimental de 14 dias, evidenciando também que os ductos pancreáticos estavam levemente dilatados com presença de fibrose acentuada em áreas interlobulares e intralobulares.

Um estudo bem recente referente aos avanços dos diagnósticos da pancreatite crônica descrito por Kwon, C. I. e colaboradores (2019), mostra a correlação entre a insuficiência exócrina com baixos níveis séricos de enzimas, particularmente da lipase, presente em 50% dos pacientes com pancreatite crônica.

A utilização dos parâmetros de níveis séricos de amilase e lipase são análises que servem de ferramentas para validar o diagnóstico de pancreatite aguda e/ou crônica, sendo bem estabelecidas na prática clínica. Os testes são usados como uma forma de triagem. Dois estudos recentes relataram baixos níveis séricos de amilase e de lipase em pacientes com diagnóstico de pancreatite crônica avançada, quando comparada aos indivíduos saudáveis e de acordo com esses estudos, quando os níveis séricos de amilase e lipase são menores do que o intervalo normal, a especificidade para diagnosticar pancreatite crônica é de 100% (KWON, C. I. et al., 2019; OH, H. C. et al., 2017).

Pode ser levantada por esse estudo a hipótese de que o aumento da glicose sérica nos animais, podendo ser advinda das alterações estruturais, decorrentes da insuficiência do pâncreas endócrino. Um estudo recente mostrou que 1,8% dos adultos com Diabetes relaciona-se com as alterações teciduais iniciais decorrentes do pâncreas exócrino, levando a consequências mais tardias do pâncreas endócrino. A maioria desses pacientes diagnosticados nesse estudo, apresentam a

Diabetes *Mellitus* tipo 2, porém os pacientes com disfunção do pâncreas exócrino, exibem graus variados desta disfunção. Aneste caso a diabetes é caracterizada por perda progressiva de massa de células β funcionais devido à redução da capacidade secretória da insulina e diminuição do número de células β 1. Entretanto, ao longo do tempo, a hiperglicemia não só pode induzir a apoptose das células β , mas também faz com que elas percam sua identidade e sua função, regredindo para um estado menos diferenciado e eventualmente levando à disfunção grave da secreção de insulina (WYNNE, K., B. et al., 2019).

Um dado de grande importância para nosso trabalho foi a investigação da atividade de tripsina, os níveis de tripsina estão diminuídos nesse estudo possivelmente decorrentes das alterações teciduais já demonstradas no processo agudo. O ensaio de tripsina tem sido sugerido como um teste laboratorial, porém, na prática clínica, não é rotineiramente usado, pois tem um custo quatro vezes maior do que os testes séricos de amilase e lipase. O uso da atividade de tripsina está voltado para a investigação de alterações genéticas da pancreatite, por ser secretada em grande quantidade, a sua ativação no local em momento errado, pode iniciar uma resposta imune, como observado na pancreatite autoimune, sugerindo que o controle adequado da atividade da tripsina poderia proporcionar um papel protetor minimizando o dano no tecido pancreático (HASAN, A., D. et al., 2018).

A investigação para elucidar o mecanismo de ativação da tripsina, foi observada na pancreatite aguda, quando o tripsinogênio era ativado prematuramente em ratos induzidos com ceruleína, causando a ativação da tripsina, desencadeando a ativação de enzimas digestivas, levando a autodigestão pancreáticas. Observou-se que a ativação prematura da tripsina possuía um papel importante para o desenvolvimento da pancreatite crônica, podendo agravar o dano a tecido através dos processos de autodigestão (JAIMIE D. et al., 2005).

A perda da função do pâncreas é principal característica após a substituição do tecido lesionado por fibrose. A participação das células estrelares é discutida em numerosos estudos que demonstram um papel fundamental no desenvolvimento de fibrose na pancreatite aguda e crônica devido ao desequilíbrio entre fibrogênese e degradação de matriz (YAMAGUCHI, M. et al., 2017). Estudos mostram que as células estreladas pancreáticas contribuem para o desenvolvimento fibrótico com a amplificação anormal da disposição da matriz extracelular (MASAMUNE, A. et al., 2008).

A presença de fibrose é decorrente da ativação das células estelares pancreáticas, que são descritas como células-chave envolvidas no processo da pancreatite (APTE, M. et al., 2013). Durante a pancreatite, em resposta ao estresse oxidativo, citocinas, fatores de crescimento e toxinas, células estelares pancreáticas secretam quantidades excessivas de proteínas da matriz extracelular, estudos têm demonstrado o papel fundamental das células no desenvolvimento de fibrose na pancreatite aguda e crônica devido ao desequilíbrio entre fibrogênese e degradação de matriz (SENDER, M. et al., 2015).

A aplicação da ceruleína para investigar o processo de fibrose no pâncreas também foi descrita por Sandler, M. e colaboradores (2015), utilizando camundongos da linhagem C57Bl6, em estudo foi realizada uma ligadura do ducto pancreático na junção entre o lobo gástrico e o duodenal e livrando o ducto biliar, impedindo a secreção do suco pancreático. Após dois dias da ligadura, foi aplicado uma única dose de ceruleína (50µg/kg) e os animais foram sacrificados nos períodos de 3, 7, 14 e 21 dias após a ligadura. Foi evidenciado que os animais desenvolveram significativamente fibrose pancreática.

No processo de fibrose foi possível também ressaltar que foi encontrado um aumento da expressão de α -SMA, proteína presente nas células estelares pancreáticas (DIMAGNO, E.P. et al., 1993). Algumas evidências iniciais mostram que a ativação persistente destas células desempenha um papel vital na fibrogênese do tecido pancreático (LONGNECKER, et al 1983; USCANGA et al., 1987).

Tian e colaboradores (2016) analisaram o fenótipo da PSCs do pâncreas de ratos e descobriram que a migração e motilidade da PSCs estão aumentadas junto com a mudança do gene relacionado, indicando que o processo de ativação das PSCs promove mudança na expressão da Matriz Extracelular (EMT) responsável pela produção de fibras de colágeno.

Fitzner e colaboradores (2012) descobriram que as PSCs cultivadas em um ambiente exposto de fatores de estresse, por um longo período, podem induzir a senescência celular. A PSC senil, expressam α -SMA e na pancreatite crônica, o número de células senis é significativamente associado com a gravidade da inflamação e fibrose. O processo de transição do fenótipo PSC está correlacionado alterações funcionais e morfológicas. As PSCs têm perda de gotículas retinóides do citosol e aumento expressão de α -SMA, estas células ativadas têm um aumento na

produção de laminina, fibronectina, colágeno tipo I e III, bem como migrar e proliferar ativamente (APTE, M. et. al., 2013).

Entre as citocinas que também podem ativar as PSCs, está entre os mais importantes o Fator de Crescimento Beta (TGF- β). Estudos demonstraram aumento da síntese de colágeno em cultura de PSCs, que foram estimuladas com TGF- β , que por sua vez é uma citocina profibrogênica comprovada, e está envolvido na regulação da ativação do PSC (SHEK F.W. et. al., 2002). A via e sinalização do TGF- β 1 também é mediada pelos Smads que são os efetores de sinalização de funções mediadas pelo TGF- β e que também lhe foi atribuído um papel regulador na função das PSC (OHNISHI, H. et. al., 2004).

Como vem sendo descrito, a característica distintiva da pancreatite crônica é o aumento da deposição de Matriz Extracelular (MEC),conseqüentemente podendo leva à fibrose, alterando a arquitetura pancreática. No modelo proposto foi possível observar uma presença marcante de deposição de colágeno no tecido, evidenciados pelo aumento dos níveis de hidroxiprolina.

A hidroxiprolina é determinante para caracterizar e evidenciar a pancreatite crônica, sendo um componente restrito ao colágeno e um importante índice de metabolismo em muitos tecidos, a presença de hidroxiprolina reflete a deposição de colágeno e o desenvolvimento de fibrose na pancreatite (KARATAS, A. et al., 2008).No entanto, ela também pode ser o resultado do aumento da atividade de colágeno, como ocorre na remodelação tecidual (PUIG-DIVÍ. V. et al., 1999). Porém é uma abordagem que possibilita estimar dano tecidual na pancreatite crônica e o envolvimento da fibrogênese(DIOGUARDI, N. et al., 2006; MOAL, F. et al., 2002).

González e colaboradores (2011), no modelo de pancreatite crônica em ratos, induzida por Cloridrato de L-arginina à 20%, mostrou o acúmulo excessivo deMatriz Extracelular(MEC) e de colágeno, além da atrofia células acinares (todas as três características típicas da pancreatite crônica humana).

No estudo de Zhao e colaboradores (2005) também realizando um modelo de pancreatite crônica experimental induzida por Dicloridrato de dibutilestanho (DBTC) em ratos, mostra que no 28º dia de experimento, foram observados aumentos nos níveis de hidroxiprolina, resutante de uma progressão mais ampla da fibrose intersticial, além disso mostrando uma relação com a a expressão da proteína α – SMA na células estelares.

A hipótese de que os eventos de pancreatite aguda causando infiltração de células inflamatórias, ativação de células estelares pancreáticas, lesão ou estresse contínuo para o desenvolvimento da fibrose, foi testada em um modelo experimental de pancreatite crônica, com o consumo continuado de álcool durante uma semana, associado a uma dieta hipercalórica e aplicação de ceruleína em ratos, demonstrando aumento significativo dos níveis de hidroxiprolina em 96 h após a indução. Evidencia-se que a hidroxiprolina pode ser um importante marcador de fibrose no processo de desenvolvimento da pancreatite crônica (DENG, X. et al., 2005).

No processo da pancreatite crônica, alterações secundárias advindas da evolução da doença, podem ser observadas. A dor é uma das principais características clínicas verificadas no paciente com pancreatite crônica e sua cinética foi explorada nesse estudo. A dor incapacita o indivíduo e está presente na maioria dos pacientes com pancreatite crônica (LOHR, J. M. et al., 2017), e pode estar associada a vários fatores.

A terapêutica relacionada ao controle da dor está voltada ao uso de analgésicos, porém podem ser inespecíficos, com baixa eficácia e muitas vezes os efeitos colaterais são presentes (CORNMANN-HOMONOFF, J. et al., 2017). Os fatores relacionados a dor na pancreatite crônica podem ser provocados por complicações secundárias, incluindo o supercrescimento bacteriano devido a alterações na motilidade, isquemia mesentérica após pancreatite aguda, estenoses do intestino delgado após neuropatia visceral relacionada à pancreatite e Diabetes *Mellitus*, por isso temos a dificuldade de um tratamento mais específico (KLEEFF, J., D. et al., 2017).

Os estudos têm se concentrado em anormalidades e aumento da pressão no ducto sistema ou tecido como causas da dor. No entanto, outros estudos encontraram alterações neuroplásticas mal adaptativas do sistema nervoso central e, em muitos casos, a dor é provavelmente de uma origem neuropática (DEMIR, I. E. et al., 2015 e POULSEN, J. L. et al., 2013).

Com exemplificado, existe uma variedade de modelos experimentais de pancreatite crônica, no entanto, muitos não correlacionam com os fatores etiológicos e/ou problemas clínicos presentes em humanos (LERCH, M.M. et al., 2010).

Fatores que ativam as vias de dor na pancreatite ainda não estão claros, as evidências sugerem que a digestão do tecido adiposo retroperitoneal por

extravasamento de lipase e fosfolipase A2 podem desencadear fatores inflamatórios locais e levar à geração de estímulos nociceptivos. Fatores como a obstrução ductal por cálculos biliares e atividade inflamatória também poderiam levar à geração de dor e é provável ainda que ocorram danos nas terminações nervosas periféricas, gerando-se estados de dor neuropática, porém esses resultados estão correlacionados o da pancreatite aguda (AGHDASSI, A. A. et al., 2004; BHATIA et al., 2005; LINDSAY et al., 2005; SCHOLZ, J. et al., 2007)

O manejo da dor pelos métodos baseados na dessensibilização nociceptiva como por exemplo, cirurgia e bloqueio dos nervos viscerais, torna-se difícil e ineficaz. Mecanismos atuais são baseados em terapias que possam substituir as terapias invasivas e que visam debelar a fonte nociceptiva. (OLESEN, S. S. et al., 2013).

Um modelo de pancreatite crônica com ratos mostrou que 3 semanas após administração intraductal TNBS, houve um aumento da atividade dos gânglios da raiz dorsal, além disso, observou-se correntes retificadoras de potássio tipo 1a no seu estado de repouso, estavam relativamente despolarizadas nesses neurônios indicando uma hipersensibilidade do nervo e, diferente do que encontrado em outros modelos de dor crônica, como colite ou cistite, não foi observada tal resposta. Neste mesmo grupo de estudo encontrou-se a expressão aumentada de TRPV1 em ratos expostos ao TNBS, onde os gânglios da raiz dorsal apresentam um aumento de quatro vezes maior de resposta a capsaicina, eles indicam que a administração sistêmica de um antagonista do TRPV1 diminuiu o comportamento da dor visceral (XU G. Y. et al., 2006).

A tripsina, presente no pâncreas, pode causar ativação e hipersensibilidade dos neurônios sensoriais. A tripsina infundida no ducto pancreático de ratos pode resultar em resposta comportamental nociceptiva, dependente da ativação dos neurônios espinhais, causando indução de dor mediado pela ativação de protease receptor-2, (PAR-2) uma família de mediadores da proteína G receptores nos dendritos dos neurônios sensoriais (KELSO, E. B. et al., 2006).

O sistema nervoso central também muda a resposta da dor na pancreatite crônica. Um estudo mostrou que pacientes com pancreatite quando submetidos a estimulação do esôfago, estômago e duodeno tinham dor aumentada, sendo essa resposta semelhante a relatada por pacientes com outros tipos de dor neuropática (DIMCEVSKI, G., S. et al., 2007). A organização do sistema nervoso central e

plasticidade subjacente ao desenvolvimento de hiperalgesia provavelmente é um fator importante na perpetuação a dor da pancreatite crônica (FREGNI, F. et al., 2007).

O estudo da dor em modelos de pancreatite crônica é ainda mais problemático de ser elucidado. Um estudo de pancreatite crônica em ratos, induzidos pela infusão de TNBS, buscou avaliada que metodologias seriam mais adequadas para o estudo da nocicepção pancreática. Foi utilizada várias metodologias como a sensibilidade mecânica do abdome, registro dos comportamentos nocivos em resposta à estimulação elétrica do pâncreas, expressão de neuropeptídeos (substância P) nos gânglios da raiz dorsal torácica e o Fator de Crescimento do Nervo no Pâncreas. Esse estudo mostra o quanto é complexo o entendimento da fisiopatologia da dor na pancreatite crônica (WINSTON, J.H. et al., 2005).

Outra evidência do aumento na regulação neuronal e hipersensibilização da dor na pancreatite encontrada em humanos, foi observado um aumento expressão da proteína associada ao crescimento 43 (GAP-43), e ao fator associado ao crescimento do nervo (FINK, T. et al., 1994). Além disso, em um estudo retrospectivo nas avaliações dos tecidos de pacientes com pancreatite crônica, mostrou um aumento da presença de mastócitos 3,5 vezes maior, em relação aos controles e a própria fibrose pancreática pode aprisionar e agravar a dor através dos nervos sensoriais pancreáticos (HOOGERWERF, W.A. et al., 2005).

As alterações resultantes do processo de inflamação juntamente com a presença de fibrose acentuada na PC, representam marcadores histológicos da PC, além disso, foi demonstrado que a dor pancreática estava relacionada à inflamação de fibras nervosas em torno do pâncreas, indicando um componente neuropático nessa dor (KLOPPEL, G. et al., 2004). Por fim a fibrose presente na PC pode exercer pressão extrínseca sobre essas estruturas e o resultado final é obstrução mecânica do ducto biliar comum e do duodeno (VIJUNGO, J.D. et al., 2003; ABDALLAH, A.A. et al., 2007).

A hiperalgesia visceral da pancreatite crônica é complexa, a discussão dos múltiplos fatores e caminhos que podem estar envolvidos na geração da hiperalgesia, apontam para manifestações diferentes. Além disto o entendimento da fisiopatologia pancreatite crônica tem a necessidade de compreender os mecanismos subjacentes envolvidos.

Podemos verificar que há uma grande complexidade da fisiopatologia da pancreatite crônica e necessitamos de mais estudos para elucidar esta patologia, acreditamos que o modelo proposto, evidencia alterações estruturais, bioquímicas e complicações secundárias, encontradas na prática clínica.

7. CONCLUSÃO

Concluimos que através da aplicação de álcool associado ao POA foi possível elaborar um modelo de pancreatite crônica, encontrando evidências de alterações morfológicas, bioquímicas e alterações secundárias descritas na prática clínica, abrindo novas investigações para elucidar a fisiopatologia da pancreatite crônica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, A. A, KRIGE, J.E.; BORNMAN, P.C. Biliary tract obstruction in chronic pancreatitis. *HPB (Oxford)* 2007; 9: 421-428 [PMID: 18345288 DOI: 10.1080/13651820701774883].

ADLER, G.; HAHN, C.; KERN, H.F, et al. Caerulein-induced pancreatitis in rats: increased lysosomal enzyme activity and autophagocytosis. *Digestion* 1985;32:10–18.

AGHDASSI, A.A, MAYERLE, J.; CHRISTOCHOWITZ, S. et al. Animal models for investigating chronic pancreatitis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2011;

APTE, M. V. et al. A starring role for stellate cells in the pancreatic cancer microenvironment. *Gastroenterology*, v. 144, n. 6, p. 1210-9, 2013. ISSN 1528-0012 (Electronic) 0016-5085.

APTE, M. V.; WILSON, J. S. Stellate cell activation in alcoholic pancreatitis. *Pancreas*, v. 27, n. 4, p. 316-20, 2005. ISSN 1536-4828 (Electronic) 0885-3177.

BALESTRIERI, M. L. et al. Understanding the immunoangiostatic CXC chemokine network. *Cardiovasc Res*, v. 78, n. 2, p. 250-6, 2008. ISSN 0008-6363 (Print) 0008-6363 .

BEER, S. et al. Comprehensive functional analysis of chymotrypsin C (CTRC) variants reveals distinct loss-of-function mechanisms associated with pancreatitis risk. *Gut* 62, 1616–1624 (2013).

BERTIN, C. et al. Pancreas divisum is not a cause of pancreatitis by itself but acts as a partner of genetic mutations. *Am J Gastroenterol*, v. 107, n. 2, p. 311-7, 2012. ISSN 1572-0241 (Electronic) 0002-9270.

BHATIA, M. et al. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol*, v. 190, n. 2, p. 117-25, 2000. ISSN 0022-3417 (Print) 0022-3417.

BOCKMAN, D. E.; MERLINO, G. Cytological changes in the pancreas of transgenic mice overexpressing transforming growth factor alpha. **Gastroenterology**, v. 103, n. 6, p. 1883-92, 1992. ISSN 0016-5085 (Print) 0016-5085.

BOREHAM, B.; AMMORI, B. J. A prospective evaluation of pancreatic exocrine function in patients with acute pancreatitis: correlation with extent of necrosis and pancreatic endocrine insufficiency. **Pancreatology**, v. 3, n. 4, p. 303-8, 2003. ISSN 1424-3903 (Print) 1424-3903.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**, v. 78, n. 3, p. 206-9, 2012. ISSN 0022-202X (Print) 0022-202X.

BRAGANZA, J. M. et al. Chronic pancreatitis. **Lancet**, v. 377, n. 9772, p. 1184-97, 2011. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736.

CAHEN, D. L. et al. Endoscopic versus surgical drainage of the pancreatic duct in chronic pancreatitis. **N Engl J Med**, v. 356, n. 7, p. 676-84, 2007. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793.

CERANOWICZ, P. et al. Protective and therapeutic effect of heparin in acute pancreatitis. **J Physiol Pharmacol**, v. 4, p. 103-25, 2008. ISSN 1899-1505 (Electronic) 0867-5910.

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

CHAUHAN S.; FORSMARK, C. E. Pain management in chronic pancreatitis: A treatment algorithm. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 24, n. 3, p. 323-35, 2010. ISSN 1532-1916 (Electronic) 1521-6918.

CONWELL, D. L. et al. Validation of Demographics, Etiology, and Risk Factors for Chronic Pancreatitis in the USA: A Report of the North American Pancreas Study

(NAPS) Group. **Dig Dis Sci**, v. 62, n. 8, p. 2133-2140, 2017. ISSN 1573-2568 (Electronic) 0163-2116.

CORNMAN-HOMONOFF, J. et al. Celiac Plexus Block and Neurolysis in the Management of Chronic Upper Abdominal Pain. **Semin Intervent Radiol**, v. 34, n. 4, p. 376-386, 2017. ISSN 0739-9529 (Print) 0739-9529.

COTE, G. A. et al. Alcohol and smoking as risk factors in an epidemiology study of patients with chronic pancreatitis. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 9, n. 3, p. 266-73, 2011. ISSN 1542-7714 (Electronic) 1542-3565.

DEMIR, I. E.; FRIESS, H.; CEYHAN, G. O. Neural plasticity in pancreatitis and pancreatic cancer. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 12, n. 11, p. 649-59, 2015. ISSN 1759-5053 (Electronic) 1759-5045.

DENG, X. et al. Chronic alcohol consumption accelerates fibrosis in response to cerulein-induced pancreatitis in rats. **Am. J. Pathol.** 166, 93–106 (2005).

DEWITT, J.; MCGREEVY, K.; LEBLANC, J.; MCHENRY, L.; CUMMINGS, O.; SHERMAN, S. EUS-guided Trucut biopsy of suspected nonfocal chronic pancreatitis. **Gastrointest Endosc.** 2005;62: 76-84.

DIMAGNO M.J., LEE S.H, HAO Y, et al. A proinflammatory, antiapoptotic phenotype underlies the susceptibility to acute pancreatitis in cystic fibrosis transmembrane regulator (-/-) mice. **Gastroenterology** 2005;129:665–681.

DIOGUARDI, N. et al. Liver fibrosis and tissue architectural change measurement using fractal-rectified metrics and Hurst's exponent. **World J Gastroenterol** 12: 2187–2194, 2006.

DIMCEVSKI, G. et al. Pain in chronic pancreatitis: the role of reorganization in the central nervous system. **Gastroenterology**, v. 132, n. 4, p. 1546-56, 2007. ISSN 0016-5085 (Print) 0016-5085.

DREWES, A. M. et al. Pain in chronic pancreatitis: the role of neuropathic pain mechanisms. **Gut**, v. 57, n. 11, p. 1616-27, 2008. ISSN 1468-3288 (Electronic) 0017-5749.

DUMONCEAU, J. M. et al. Endoscopic treatment of chronic pancreatitis: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Clinical Guideline. **Endoscopy**, v. 44, n. 8, p. 784-800, 2012. ISSN 1438-8812.

FINK T, DI SEBASTIANO P, BU CHLER M, BEGER HG, WEIHE E. Growth-associated protein-43 and protein gene-product 9.5 innervation in human pancreas: changes in chronic pancreatitis. **Neuroscience** 1994; 63: 249–66. PMID: 7898650.

FITZNER, B., MÜLLER, S., WALTHER, M., FISCHER, M., ENGELMANN, R., MÜLLER-HILKE, B., et al. (2012). Senescence determines the fate of activated rat pancreatic stellate cells. **J. Cell. Mol. Med.** 16, 2620–2630. doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01573.

FJELD, K. et al. A recombined allele of the lipase gene CEL and its pseudogene CELP confers susceptibility to chronic pancreatitis. **Nat. Genet.** 47, 518–522 (2015).

FJELD, K. et al. Length of variable numbers of tandem repeats in the carboxyl ester lipase (CEL) gene may confer susceptibility to alcoholic liver cirrhosis but not alcoholic chronic pancreatitis. **PLoS ONE** 11, e0165567 (2016).

FREGNI, F.; PASCUAL-LEONE, A.; FREEDMAN, S. D. Pain in chronic pancreatitis: a salutogenic mechanism or a maladaptive brain response? **Pancreatology**, v. 7, n. 5-6, p. 411-22, 2007. ISSN 1424-3911 (Electronic) 1424-3903.

FRIEDMAN, S. L.; ROLL, F. J. Isolation and culture of hepatic lipocytes, Kupffer cells, and sinusoidal endothelial cells by density gradient centrifugation with Stractan. **Anal Biochem**, 2011 v. 161, n. 1, p. 207-18, 20. ISSN 0003-2697.

TOSKES, P.P.; FORSMARK, C.E.; DEMEO, M.T. et al. A multicenter controlled trial of octreotide for the pain of chronic pancreatitis (abstract). *Pancreas*. 2006.8:774.

GIEFER, M. J. et al. Early-Onset Acute Recurrent and Chronic Pancreatitis Is Associated with PRSS1 or CTRC Gene Mutations. **J Pediatr**, v. 186, p. 95-100, 2017. ISSN 1097-6833.

GONZÁLEZ, A.M. et al. Assessment of the protective effects of oral tocotrienols in arginine chronic-like pancreatitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2011.

GROCOCK, C. J. et al. The variable phenotype of the p.A16V mutation of cationic trypsinogen (PRSS1) in pancreatitis families. **Gut**, v. 59, n. 3, p. 357-63, 2010. ISSN 1468-3288 (Electronic) 0017-5749.

GUKOVSKAYA, A. S. et al. Ethanol metabolism and transcription factor activation in pancreatic acinar cells in rats. **Gastroenterology**, v. 122, n. 1, p. 106-18, 2002. ISSN 0016-5085.

HASAN, A.; MOSCOSO, D. I.; KASTRINOS, F. The Role of Genetics in Pancreatitis. **Gastrointest Endosc Clin N Am**, v. 28, n. 4, p. 587-603, 2018. ISSN 1558-1950 (Electronic) 1052-5157.

HIROTA, M. et al. The seventh nationwide epidemiological survey for chronic pancreatitis in Japan: clinical significance of smoking habit in Japanese patients. **Pancreatology**, v. 14, n. 6, p. 490-6, 2014. ISSN 1424-3911.

HOFFMEISTER, A. et al. English language version of the S3-consensus guidelines on chronic pancreatitis: Definition, aetiology, diagnostic examinations, medical, endoscopic and surgical management of chronic pancreatitis. **Z Gastroenterol**, v. 53, n. 12, p. 1447-95, 2015. ISSN 1439-7803 (Electronic) 0044-2771.

HOOGERWERF W.A, GONDESEN K, XIAO S.Y, et al. The role of mast cells in the pathogenesis of pain in chronic pancreatitis. **BMC Gastroenterol** 2005; 5: 8. PMID: 15745445.

HOUBRACKEN, I. et al. Lineage tracing evidence for transdifferentiation of acinar to duct cells and plasticity of human pancreas. **Gastroenterology**, v. 141, n. 2, p. 731-41, 2011. ISSN 1528-0012.

HUANG, W. et al. Fatty acid ethyl ester synthase inhibition ameliorates ethanol-induced Ca²⁺-dependent mitochondrial dysfunction and acute pancreatitis. **Gut**, v. 63, n. 8, p. 1313-24, 2014. ISSN 1468-3288 (Electronic) 0017-5749.

IDA S, OHMURAYA M, HIROTA M, et al. Chronic pancreatitis in mice by treatment with choline-deficient ethionine-supplemented diet. *Exp Anim* 2010;59:421–429.

JADAD, A. R.; BROWMAN, G. P. The WHO analgesic ladder for cancer pain management. Stepping up the quality of its evaluation. **Jama**, v. 274, n. 23, p. 1870-3, 1995. ISSN 0098-7484 (Print) 0098-7484.

JAIMIE D. NATHAN, JOELLE ROMAC, RUTH Y. PENG, MICHAEL PEYTON, RAYMOND J. MACDONALD, and RODGER A. LIDDLE, Transgenic Expression of Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor-I Ameliorates Secretagogue-Induced Pancreatitis in Mice. **GASTROENTEROLOGY** 2005;128:717–727.

JASTER, R. Molecular regulation of pancreatic stellate cell function. **Mol Cancer**, v. 3, n. 26, p. 1476-4598, 2004. ISSN 1476-4598 (Electronic) 1476-4598.

JOHNSON, C. D. et al. Qualitative Assessment of the Symptoms and Impact of Pancreatic Exocrine Insufficiency (PEI) to Inform the Development of a Patient-Reported Outcome (PRO) Instrument. **Patient**, v. 10, n. 5, p. 615-628, 2017. ISSN 1178-1661 (Electronic) 1178-1653.

JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J**, v. 11, n. 4, p. 447-55, 1979. ISSN 0018-2214.

KARATAS, A. et al. The effect of halofuginone, a specific inhibitor of collagen type 1 synthesis, in the prevention of pancreatic fibrosis in an experimental model of severe hyperstimulation and obstruction pancreatitis. **J Surg Res** 2008; 148: 7-12.

KELSO, E. B. et al. Therapeutic promise of proteinase-activated receptor-2 antagonism in joint inflammation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 316, n. 3, p. 1017-24, 2006. ISSN 0022-3565 (Print) 0022-3565.

KENNEDY, R. H. et al. Pancreatic extracellular matrix alterations in chronic pancreatitis. **Pancreas**, v. 2, n. 1, p. 61-72, 1987. ISSN 0885-3177 (Print) 0885-3177.

KIM, Y. J. et al. Novel application of proton pump inhibitor for the prevention of colitis-induced colorectal carcinogenesis beyond acid suppression. **Cancer Prev Res**, v. 3, n. 8, p. 963-74, 2010. ISSN 1940-6215.

KIMURA, W.; NAGAI, H.; KURODA, A.; MUTO, T.; ESAKI, Y. Analysis of small cystic lesions of the pancreas. **Int J Pancreatol**. 1995 Dec;18(3):197-206.

KLEEFF, J. et al. Chronic pancreatitis. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, n. 17060, p. 60, 2017. ISSN 2056-676X (Electronic) 2056-676X.

KLOPPEL G, DETLEFSEN S, FEYERABEND B. Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern. **Virchows Arch** 2004;445:1-8.

KNOOK, D. L.; SEFFELAAR, A. M.; DE LEEUW, A. M. Fat-storing cells of the rat liver. Their isolation and purification. **Exp Cell Res**, v. 139, n. 2, p. 468-71, 1982. ISSN 0014-4827.

KHOKHAR, A. S.; SENIDNER, D. L.. The pathophysiology of pancreatitis. **Nutr Clin Pract.**, v.19, p.5-15, 2004.

KRAYCHETE, D. C.; GUIMARAES, A. C. Hiperalgesia visceral e dor abdominal crônica: abordagem diagnóstica e terapêutica. **Rev. Bras. Anesthesiol.** [online].

2003, vol.53, n.6, pp.833-853. ISSN 0034-7094. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-70942003000600014>.

MURPHY, J. A.; CRIDDLE, D.N; SHERWOOD, M. et al., Direct activation of cytosolic Ca² signaling and enzyme secretion by cholecystokinin in human pancreatic acinar cells. **Gastroenterology**, v. 135, n,2, p.632-641. 2008

KWON, C. I. et al. Recent advances in the diagnosis and management of chronic pancreatitis. **Korean J Intern Med**, v. 34, n. 2, p. 242-260, 2019. ISSN 2005-6648 (Electronic) 1226-3303.

HEGYI, P.; PANDOL, S.; VENGLOVECS, V. et al. The acinar-ductal tango in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut*, v. 60, p. 544-552, 2011.

FRULLONI, L. et al., Italian consensus guidelines for chronic pancreatitis. **Dig Liver Dis.**, v. 42 Suppl 6, p. S381-S406, 2010.

LAPOSATA, E. A.; LANGE, L. G. Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. **Science**, v. 231, n. 4737, p. 497-9, 1986. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-807.

LAYER P., MELLE U. et al. (2005) Chronic Pancreatitis: definition and classification for clinical practice. In: *Clinical Pancreatology: For practising gastroenterologists and surgeons* 91. 2005. Dominguéz-Muñoz J. And Malfertheiner P., ed, pp201-213. **Oxford:Blackwell Publishing Ltd.**

LERCH M.M, SALUJA AK, DAWRA R, et al. Acute necrotizing pancreatitis in the opossum: earliest morphological changes involve acinar cells. **Gastroenterology** 1992;103:205–213.

LEUNG, P. S.; CHAN, Y. C. Role of oxidative stress in pancreatic inflammation. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 1, p. 135-65, 2009. ISSN 1557-7716 (Electronic) 1523-0864.

LEVY, P. et al. Epidemiology of chronic pancreatitis: burden of the disease and consequences. **United European Gastroenterol J**, v. 2, n. 5, p. 345-54, 2014. ISSN 2050-6406 (Print) 2050-640.

LIEB, J. G., 2ND; FORSMARK, C. E. Review article: pain and chronic pancreatitis. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 29, n. 7, p. 706-19, 2009. ISSN 1365-2036 (Electronic) 0269-281.

LIN, Y. et al. Associations of alcohol drinking and nutrient intake with chronic pancreatitis: findings from a case-control study in Japan. **Am J Gastroenterol**, v. 96, n. 9, p. 2622-7, 2001. ISSN 0002-9270 (Print) 0002-9270.

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

LOHR, J. M. et al. United European Gastroenterology evidence-based guidelines for the diagnosis and therapy of chronic pancreatitis (HaPanEU). **United European Gastroenterol J**, v. 5, n. 2, p. 153-199, 2017. ISSN 2050-6406 (Print) 2050-6406.

LONGNECKER, D. S. Pathology and pathogenesis of diseases of the pancreas. **Am J Pathol**, v. 107, n. 1, p. 99-121, 1982. ISSN 0002-9440 (Print) 0002-9440.

LOWENFELS, A.B.; MAISONNEUVE, P.; DIMAGNO, E.P. et al. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. **J Natl Cancer Inst**. 1994; 89:442-6. [PubMed: 9091646.

MAARTENSE, S.; LEDEBOER, M.; MASCLEE, A. A. Chronic pancreatitis: relation between function and morphology. **Dig Liver Dis**, v. 36, n. 1, p. 61-7, 2004. ISSN 1590-8658 (Print) 1590-8658.

MARIANI, A.; TESTONI, P. A. Is acute recurrent pancreatitis a chronic disease? **World J Gastroenterol**, v. 14, n. 7, p. 995-8, 2008. ISSN 1007-9327 (Print) 1007-9327.

MARRACHE F, TU SP, BHAGAT G, et al. Overexpression of interleukin-1beta in the murine pancreas results in chronic pancreatitis. **Gastroenterology** 2008;135:1277–1287.

MASAMUNE, A. et al. Hypoxia stimulates pancreatic stellate cells to induce fibrosis and angiogenesis in pancreatic cancer. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 295, n. 4, p. 31, 2008. ISSN 0193-1857 (Print) 0193-1857.

MIYAUCHI M, SUDA K, KUWAYAMA C, et al. Role of fibrosis-related genes and pancreatic duct obstruction in rat pancreatitis models: implications for chronic pancreatitis. **Histol Histopathol** 2007;22:1119–1127.

MOLERO, X. et al. [New horizons in the mechanisms of acute and chronic pancreatic damage]. **Gastroenterol Hepatol**, v. 26, n. 7, p. 437-46, 2003. ISSN 0210-5705 (Print) 0210-5705.

MORENO, C. et al. Chemokine receptor CCR5 deficiency exacerbates cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 291, n. 6, p. 3, 2006. ISSN 0193-1857 (Print) 0193-1857.

MORISSET, J. Negative control of human pancreatic secretion: physiological mechanisms and factors. **Pancreas**, v. 37, n. 1, p. 1-12, 2008. ISSN 1536-4828 (Electronic) 0885-3177.

MUDDANA, V. et al. Association between calcium sensing receptor gene polymorphisms and chronic pancreatitis in a US population: role of serine protease inhibitor Kazal 1 type and alcohol. **World J. Gastroenterol**. 14, 4486–4491 (2008).

MUNIRAJ, T. et al. Chronic pancreatitis, a comprehensive review and update. Part I: epidemiology, etiology, risk factors, genetics, pathophysiology, and clinical features. **Disease-a-Month** Volume 60, Issue 12, December 2014, Pages 530-550

NEUSCHWANDER-TETRI B.A, BRIDLE K.R, WELLS L.D, et al. Repetitive acute pancreatic injury in the mouse induces procollagen alpha1(I) expression colocalized to pancreatic stellate cells. **Lab Invest** 2000;80:143–150.

NEVES, D. P.: 2010. Parasitologia Humana, 11^a edição, **Editora Atheneu**, São Paulo, 494 p.

NIEMANN, T. et al. Opioid treatment of painful chronic pancreatitis. **Int J Pancreatol**, v. 27, n. 3, p. 235-40, 2000. ISSN 0169-4197 (Print) 0169-4197.

OH, H. C. et al. Low Serum Pancreatic Amylase and Lipase Values Are Simple and Useful Predictors to Diagnose Chronic Pancreatitis. **Gut Liver**, v. 11, n. 6, p. 878-883, 2017. ISSN 2005-1212 (Electronic) 1976-2283.

OHNISHI H, MIYATA T, YASUDA H, SATOH Y, HANATSUKA K, KITA H, OHASHI A, TAMADA K, MAKITA N, IIRI T, UEDA N, MASHIMA H, SUGANO K. Distinct roles of Smad2-, Smad3-, and ERK-dependent pathways in transforming growth factor-beta1 regulation of pancreatic stellate cellular functions. **J Biol Chem** 2004; 279: 8873-8878 [PMID: 14688282 DOI: 10.1074/jbc.M309698200].

OLESEN, S. S. et al. Pain severity reduces life quality in chronic pancreatitis: Implications for design of future outcome trials. **Pancreatology**, v. 14, n. 6, p. 497-502, 2014. ISSN 1424-3911 (Electronic) 1424-3903.

OLESEN, S. S. et al. Pharmacological pain management in chronic pancreatitis. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 42, p. 7292-301, 2013. ISSN 2219-2840 (Electronic) 1007-9327.

OLESEN, S. S. et al. Pregabalin reduces pain in patients with chronic pancreatitis in a randomized, controlled trial. **Gastroenterology**, v. 141, n. 2, p. 536-43, 2011. ISSN 1528-0012 (Electronic) 0016-5085.

OMARY, M. B. et al. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. **J Clin Invest**, v. 117, n. 1, p. 50-9, 2007. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738.

OTANI T, MATSUKURA A, TAKAMOTO T, et al. Effects of pancreatic duct ligation on pancreatic response to bombesin. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2006;290:G633–G639.

PANDOL, S. J.; FORSMARK, C. E.; HART, P. A. Acceleration of our understanding of recurrent acute and chronic pancreatitis. **Pancreatology**, v. 16, n. 5, p. 692-3, 2016. ISSN 1424-3911 (Electronic) 1424-3903.

PEERY, A. F. et al. Burden of gastrointestinal disease in the United States: 2012 update. **Gastroenterology**, v. 143, n. 5, p. 1179-1187, 2012. ISSN 1528-0012 (Electronic) 0016-5085.

PENDHARKAR, S. A.; MATHEW, J.; PETROV, M. S. Age- and sex-specific prevalence of diabetes associated with diseases of the exocrine pancreas: A population-based study. **Dig Liver Dis**, v. 49, n. 5, p. 540-544, 2017. ISSN 1878-3562 (Electronic) 1590-8658.

POULSEN, J. L. et al. Pain and chronic pancreatitis: a complex interplay of multiple mechanisms. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 42, p. 7282-91, 2013. ISSN 2219-2840 (Electronic) 1007-9327.

PUCHTLER, H.; WALDROP, F. S.; VALENTINE, L. S. Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. **Beitr Pathol**, v. 150, n. 2, p. 174-87, 1973. ISSN 0005-8165 (Print) 0005-8165.

PUIG-DIVI V, MOLERO X, SALAS A, et al. Induction of chronic pancreatic disease by trinitrobenzene sulfonic acid infusion into rat pancreatic ducts. **Pancreas** 1996;13:417–424.

PUIG-DIVÍ, V. et al. Ethanol feeding aggravates morphological and biochemical parameters in experimental chronic pancreatitis. **Digestion** 60: 166–174, 1999.

PUROHIT, V.; RUSSO, D.; SALIN, M. Role of iron in alcoholic liver disease: introduction and summary of the symposium. **Alcohol**. 2003 Jun;30(2):93-7., ISBN 0741-8329 (Print) 0741-8329.

PUROHIT, V.; RUSSO D.; SALIN, M.; BROWN, R. Mechanisms of alcoholic pancreatitis: introduction and summary of the symposium. **Pancreas**. 2003;27(4):281-5.

REBOURS, V. et al. Smoking and the course of recurrent acute and chronic alcoholic pancreatitis: a dose-dependent relationship. **Pancreas**, v. 41, n. 8, p. 1219-24, 2012. ISSN 1536-4828 (Electronic) 0885-3177.

RICKELS, M. R. et al. Detection, evaluation and treatment of diabetes mellitus in chronic pancreatitis: recommendations from PancreasFest 2012. **Pancreatology**, v. 13, n. 4, p. 336-42, 2013. ISSN 1424-3911 (Electronic) 1424-390.

ROMAGNUOLO, J. et al. Clinical Profile, Etiology, and Treatment of Chronic Pancreatitis in North American Women: Analysis of a Large Multicenter Cohort. **Pancreas**, v. 45, n. 7, p. 934-40, 2016. ISSN 1536-4828 (Electronic) 0885-3177.

SAH, R. P. et al. Cerulein-induced chronic pancreatitis does not require intra-acinar activation of trypsinogen in mice. **Gastroenterology**, v. 144, n. 5, p. 1076-1085, 2013. ISSN 1528-0012 (Electronic) 0016-5085.

SANDGREN, E. P. et al. Overexpression of TGF alpha in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast. **Cell**, v. 61, n. 6, p. 1121-35, 1990. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.

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

SCHWARTZ, E. S. et al. Synergistic role of TRPV1 and TRPA1 in pancreatic pain and inflammation. **Gastroenterology**, v. 140, n. 4, p. 1283-1291, 2011. ISSN 1528-0012 (Electronic) 0016-5085.

SCHWARZENBERG, S. J. et al. Pediatric chronic pancreatitis is associated with genetic risk factors and substantial disease burden. **J Pediatr**, v. 166, n. 4, p. 890-896, 2015. ISSN 1097-6833 (Electronic) 0022-3476.

SENDLER, M. et al. Complement Component 5 Mediates Development of Fibrosis, via Activation of Stellate Cells, in 2 Mouse Models of Chronic Pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 149, n. 3, p. 765-76, 2015. ISSN 1528-0012 (Electronic) 0016-5085.

SENDLER, M. et al. Tumour necrosis factor alpha secretion induces protease activation and acinar cell necrosis in acute experimental pancreatitis in mice. **Gut**, v. 62, n. 3, p. 430-9, 2013. ISSN 1468-3288 (Electronic) 0017-5749.

SHEK FW, BENYON RC, WALKER FM, MCCRUDDEN PR, PENDER SL, WILLIAMS EJ, JOHNSON PA, JOHNSON CD, BATEMAN AC, FINE DR, IREDALE JP. Expression of transforming growth factor-beta 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis. **Am J Pathol** 2002; 160: 1787-1798.

SHIMOSEGAWA, T. et al. The revised Japanese clinical diagnostic criteria for chronic pancreatitis. **J Gastroenterol**, v. 45, n. 6, p. 584-91, 2010. ISSN 1435-5922 (Electronic) 0944-1174.

SU, K. H.; CUTHBERTSON, C.; CHRISTOPHI, C. Review of experimental animal models of acute pancreatitis. **HPB**, v. 8, n. 4, p. 264-86, 2006. ISSN 1365-182X (Print) 1365-182X.

SUDA, K.; TSUKAHARA, M. Histopathological and immunohistochemical studies on apparently uninvolved areas of pancreas in patients with acute pancreatitis. **Arch Pathol Lab Med**, v. 116, n. 9, p. 934-7, 1992. ISSN 0003-9985 (Print) 0003-9985.

THROWER, E. Pathologic cellular events in smoking-related pancreatitis. **Cancers**, v. 7, n. 2, p. 723-35, 2015. ISSN 2072-6694 (Print) 2072-6694.

TIAN, L., LU, Z. P., CAI, B. B., ZHAO, L. T., QIAN, D., XU, Q. C., et al. (2016). Activation of pancreatic stellate cells involves an EMT-like process. **Int. J. Oncol.** 48, 783–792. doi: 10.3892/ijo.2015.3282.

TREIBER M, NEUHOFER P, ANETSBERGER E, et al. Myeloid, but not pancreatic, RelA/p65 is required for fibrosis in a mouse model of chronic pancreatitis. **Gastroenterology** 2011;141:1473–1485, 1485.e1–7.

USCANGA, L. et al. Sequential connective matrix changes in experimental acute pancreatitis. An immunohistochemical and biochemical assessment in the rat. **Int J Pancreatol**, v. 2, n. 1, p. 33-45, 1987. ISSN 0169-4197 (Print) 0169-4197.

VIJUNGO JD, PRINZ RA. Management of biliary and duodenal complications of chronic pancreatitis. **World J Surg** 2003; 27: 1258-1270 [PMID: 14534824 DOI: 10.1007/ s00268-003-7246-7].

VIOLA, A.; LUSTER, A. D. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 48, p. 171-97, 2008. ISSN 0362-1642 (Print) 0362-1642.

VONLAUFEN A, PHILLIPS PA, XU Z, et al. Withdrawal of alcohol promotes regression while continued alcohol intake promotes persistence of LPS-induced pancreatic injury in alcohol-fed rats. **Gut** 2011;60:238–246.

VONLAUFEN A, XU Z, DANIEL B, et al. Bacterial endotoxin: a trigger factor for alcoholic pancreatitis? Evidence from a novel, physiologically relevant animal model. **Gastroenterology** 2007;133: 1293–1303.

WANG, W. et al. Temporal changes of astrocyte activation and glutamate transporter-1 expression in the spinal cord after spinal nerve ligation-induced neuropathic pain. **Anat Rec**, v. 291, n. 5, p. 513-8, 2008. ISSN 1932-8486 (Print) 1932-8486.

WATANABE T, MASAMUNE A, KIKUTA K, et al. Bone marrow contributes to the population of pancreatic stellate cells in mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2009;297:G1138– G1146.

WHITCOMB, D. C. et al. Chronic pancreatitis: An international draft consensus proposal for a new mechanistic definition. **Pancreatology**, v. 16, n. 2, p. 218-24, 2016. ISSN 1424-3911 (Electronic) 1424-3903.

WHITCOMB, D. C. Genetic risk factors for pancreatic disorders. **Gastroenterology**, v. 144, n. 6, p. 1292-302, 2013. ISSN 1528-0012 (Electronic) 0016-5085.

WILDER-SMITH, C. H. et al. Effect of tramadol and morphine on pain and gastrointestinal motor function in patients with chronic pancreatitis. **Dig Dis Sci**, v. 44, n. 6, p. 1107-16, 1999. ISSN 0163-2116 (Print) 0163-2116 (Linking).

WILSON, J. S.; APTE, M. V. Role of alcohol metabolism in alcoholic pancreatitis. **Pancreas**, v. 27, n. 4, p. 311-5, 2003. ISSN 1536-4828 (Electronic) 0885-3177 (Linking).

WINSTON J.H, HE Z.J, SHENOY M, XIAO S.Y, PASRICHA P.J. et al. Molecular and behavioral changes in nociception in a novel rat model of chronic pancreatitis for the study of pain. **Pain** 2005; 117: 214–22.

WITT, H. et al. Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. **Gastroenterology**, v. 132, n. 4, p. 1557-73, 2007. ISSN 0016-5085 (Print) 0016-5085 (Linking).

WITT, H. et al. Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis. **Nat. Genet.** 45, 1216–1220 (2013).

WYNNE, K.; DEVEREAUX, B.; DORNHORST, A. Diabetes of the exocrine pancreas. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 34, n. 2, p. 346-354, 2019. ISSN 1440-1746 (Electronic) 0815-9319.

XIAO, A. Y. et al. Global incidence and mortality of pancreatic diseases: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression of population-based cohort studies. **Lancet Gastroenterol Hepatol**, v. 1, n. 1, p. 45-55, 2016. ISSN 2468-1253.

XU, G. Y. et al. Enhanced excitability and suppression of A-type K⁺ current of pancreas-specific afferent neurons in a rat model of chronic pancreatitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 291, n. 3, p. 27, 2006. ISSN 0193-1857 (Print) 0193-1857.

YADAV, D. et al. Incidence, prevalence, and survival of chronic pancreatitis: a population-based study. **Am J Gastroenterol**, v. 106, n. 12, p. 2192-9, 2011. ISSN 1572-0241 (Electronic) 0002-9270.

YADAV, D.; PAPACHRISTOU, G. I.; WHITCOMB, D. C. Alcohol-associated pancreatitis. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 36, n. 2, p. 219-38, 2007. ISSN 0889-8553 (Print) 0889-8553.

YADAV, D.; WHITCOMB, D. C. The role of alcohol and smoking in pancreatitis. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 7, n. 3, p. 131-45, 2010. ISSN 1759-5053 (Electronic) 1759-5045.

YAMAGUCHI, M. et al. Bicarbonate-rich fluid secretion predicted by a computational model of guinea-pig pancreatic duct epithelium. **J Physiol**, v. 595, n. 6, p. 1947-1972, 2017. ISSN 1469-7793 (Electronic) 0022-3751.

YAMAMOTO, M.; OTANI, M.; OTSUKI, M. A new model of chronic pancreatitis in rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 291, n. 4, 2006. ISSN 0193-1857 (Print) 0193-1857.

YAMASAKI M, TAKEYAMA Y, SHINKAI M, et al. Pancreatic and bile duct obstruction exacerbates rat caerulein-induced pancreatitis: a new experimental model of acute hemorrhagic pancreatitis. **J Gastroenterol** 2006;41:352–360.

ZHAO, H.F.et al.. Anti-monocyte chemoattractantprotein 1 gene therapy attenuates experimental chronicpancreatitis induced by dibutyltin dichloride in rats. **Gut** 2005; 54:1759-1767.

ZHU Y, MEHTA K, LI C, et al. Systemic administration of anti-NGF increases A-type potassium currents and decreases pancreatic nociceptor excitability in a rat model of chronic pancreatitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2012;302:G176–G181.

ZHU, Y. et al. Nerve growth factor modulates TRPV1 expression and function and mediates pain in chronic pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 141, n. 1, p. 370-7, 2011. ISSN 1528-0012 (Electronic) 0016-5085.

9. ANEXOS



Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
 Cep: 60430-270 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “AVALIAÇÃO DO TGF- β E DE CELULAS PANCREÁTICAS ESTRELARES NA PANCREATITE EXPERIMENTAL CRÔNICA”, protocolo nº 24/2016, sob responsabilidade do Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Pontes de Souza, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 06 de julho de 2016.

Vigência do projeto	01/04/2015 a 01/04/2018
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico swiss
Nº de Animais	1000
Peso/Idade	25-30g / 8 a 12 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 06 de julho de 2016.


 Prof. Dr. Rodrigo Siqueira
 Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siape: 1520734