

ENILTON APARECIDO CAMARGO

**CARACTERIZAÇÃO DA PANCREATITE AGUDA INDUZIDA
POR FOSFOLIPASES A₂ SECRETÓRIAS**

Campinas, fevereiro de 2007

ENILTON APARECIDO CAMARGO

**CARACTERIZAÇÃO DA PANCREATITE AGUDA INDUZIDA
POR FOSFOLIPASES A₂ SECRETÓRIAS**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Campinas, fevereiro de 2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C14c Camargo, Enilton Aparecido
 Caracterização da pancreatite aguda induzida por fosfolipases A2
 secretórias / Enilton Aparecido Camargo. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Edson Antunes
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Fosfolipases A. 2. Pancreatite. 3. Inflamação. I.
Antunes, Edson. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Characterization of the acute pancreatitis induced by secretory
phospholipases A2**

Keywords: • Phospholipases A

- Pancreatitis
- Inflammation

Titulação: Doutorado em Farmacologia

Banca examinadora: Prof Dr Edson Antunes

Profa. Dra. Soraia Kátia Pereira Costa

Profa. Dra. Sonia Jancar Negro

Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Profa. Dra. Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin

Data da defesa: 13-02-2007



Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. Edson Antunes

Membros:

Profª. Dra. Soraia Kátia Pereira Costa

Profª. Dra. Sonia Jancar Negro

Profª. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito

Profª. Dra. Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 13/02/2007

DEDICATÓRIA

A Deus, por ter me concedido vida e saúde
e por ter me conduzido até o dia de hoje;

À minha amada mamãe, Maria Verônica,
que primeiramente me incentivou a buscar o conhecimento e
carinhosamente me acompanhou durante todo esse tempo;

À minha querida esposa, Zaine, que se doou para mim,
aconselhando-me e auxiliando-me durante todo esse período.
Não teria conseguido sem seu precioso auxílio e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edson Antunes, pela orientação, amizade e oportunidade de trabalhar em seu grupo, onde pude aprender e crescer muito ao longo desses anos;

À Dr^a. Elen Landucci, idealizadora desse trabalho, através de quem vim a este departamento e que mais que tudo, sempre foi minha amiga;

Ao Prof. Stephen Hyslop pela amizade e ótima convivência em todos esses anos;

Aos Professores Angelina Zanesco, Cleber Teixeira, Sisi Marcondes, Marcelo Muscarã, Sérgio Marangoni, Alice Bricola e Heitor Moreno;

À Prof^a. Maria Teresa Ribela (IPEN/CENEN – USP) pela colaboração com a marcação da albumina com I¹²⁵

Ao Dr. Marcelo Esquisatto (UNIRARAS) pela colaboração com as análises morfológicas;

As grandes amigas Ivani de Souza e Simone Teixeira pela força, companheirismo e por terem me ensinado muitas coisas;

As amigas Soraia Costa e Marta Medeiros com quem aprendi muitas coisas no início da minha jornada no laboratório;

À grande amiga e colaboradora Tatiane Ferreira, pela preciosa ajuda nos experimentos e convivência no laboratório;

Aos amigos que já passaram pelo laboratório: Laura Esquisatto, Paula Rubya, Lúcia Martins, Carla Penteado, Márcia Cardoso e Juliana Moreira: que saudades de conviver com vocês;

À amiga Cristiane Freitas, pela ótima convivência e por sempre fazer com que as coisas pareçam tão simples;

Aos grandes amigos do Edema: Nádja Mariano, Gláucia Coelho, Adriana Rampazio, Fábio Marangoni, Luís Gustavo e Mônica: vocês tornam tudo alegria;

Aos amigos “cascateiros”: Fernando Bau, Rafael Annovazzi, Maria Andréia Delbin, Camila de Moraes, Juliana Baracat, Mario Claudino, Fernanda Priviero, Haroldo Flores e Fabíola Mônica;

Aos amigos do Lab de células: Lineu, Priscila, Letícia Lintomen, Rafael Morganti e Luciana;

Aos demais amigos da UNICAMP: Ricardo Kalaf, Elionai, Raquel, Cristina, Ana Maria, Christiane, Juliana Minardi, Thomas, Alessandra Linardi, Kiara, Lourdes, Maricene, Juliana Mattoso, Érika dos Anjos, Cássia, Renata Scatamburlo, Renata Karl, Rafaela, Sandro e Saraquaci;

Aos funcionários do departamento de Farmacologia pela preciosa colaboração e convivência: Miguel, Marcos, José Ilton, Elaine, Fran, Aline, Adilson, Toninho, Gilão, Wanderlei, Alessandra e Guina;

A toda a minha família, em especial, meu pai Alcindo, meus irmãos José Augusto e Juliana e minha cunhada Ivete.

À FAPESP pelo apoio financeiro,

Aos animais que, involuntariamente, contribuíram com suas vidas.

"A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e depois afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer de nós é coragem."

Guimarães Rosa, Grande Sertão: Veredas

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	xv
Lista de materiais.....	xvii
Lista de figuras e tabelas.....	xix
Resumo.....	xxi
Abstract.....	xxiii
1. INTRODUÇÃO	25
1.1. Pancreatite aguda.....	25
1.1.1. Ácinos pancreáticos estimulados <i>in vitro</i>	28
1.1.2. Modelos de pancreatite experimental	30
1.1.3. Mediadores inflamatórios envolvidos na pancreatite aguda.....	30
1.2. FOSFOLIPASES A ₂ (PLA ₂)	34
1.2.1. Aspectos estruturais, classificação e funções das PLA ₂	34
1.2.2. Atividade inflamatória de PLA ₂ s administradas exogenamente	36
1.2.3. Papel das PLA ₂ s na pancreatite aguda.....	38
2. OBJETIVOS	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1. Animais.....	41
3.2. Obtenção da piratoxina-I e da bothropstoxina-II.....	41
3.3. Indução e caracterização da pancreatite aguda.....	41
3.3.1. Indução da pancreatite	41
3.3.2. Medida do edema pancreático	42
3.3.3. Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO) no pâncreas e pulmão.....	43
3.3.4. Determinação de amilase sérica	43
3.3.5. Determinação do TNF- α no soro	43
3.3.6. Preparação do pâncreas e pulmão para estudos histológicos	44
3.3.7. Tratamentos com antagonistas e inibidores farmacológicos	44

3.4.	Estimulação de ácidos pancreáticos <i>in vitro</i>	46
3.4.1.	Obtenção dos ácidos pancreáticos isolados	46
3.4.2.	Estimulação dos ácidos pancreáticos com as PLA ₂ s	46
3.4.3.	Ensaio de atividade celular pelo MTT	47
3.5.	Análise estatística	47
4.	RESULTADOS:	49
4.1.	Efeito da injeção de piratoxina-I no ducto biliopancreático de ratos	49
4.1.1.	Curvas dose e tempo-efeito	49
4.1.2.	Alterações histológicas no pâncreas e pulmão de ratos submetidos à injeção da piratoxina-I no ducto biliopancreático	53
4.2.	Participação da atividade catalítica das PLA ₂ s secretórias na indução da pancreatite aguda e estimulação <i>in vitro</i> de ácidos pancreáticos	56
4.2.1.	Influência da atividade catalítica das PLA ₂ secretórias sobre os efeitos inflamatórios locais da pancreatite	56
4.2.2.	Influência da atividade catalítica das PLA ₂ secretórias sobre o influxo de neutrófilos no pulmão	57
4.2.3.	Influência da atividade catalítica das PLA ₂ secretórias sobre os níveis séricos de amilase	57
4.2.4.	Influência da atividade catalítica das PLA ₂ secretórias sobre a secreção de amilase de ácidos pancreáticos isolados	59
4.3.	Mediadores envolvidos na pancreatite induzida pelas PLA ₂ secretórias	61
4.3.1.	Efeito dos diversos tratamentos sobre os eventos inflamatórios locais	61
4.3.2.	Efeito dos diversos tratamentos sobre o influxo neutrofílico pulmonar	65
4.3.3.	Efeito dos diversos tratamentos sobre os níveis séricos de amilase	65
4.3.4.	Efeito dos diversos tratamentos sobre os níveis de TNF- α no soro	70
4.3.5.	Sumário dos resultados com os tratamentos	73
5.	DISCUSSÃO:	74
6.	SUMÁRIO E CONCLUSÕES	88
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
	ANEXO I	107
	ANEXO II	113

LISTA DE ABREVIATURAS

AA861	(2-[12-hidroxidodeca-5,10-dienil]-3,5,6-trimetil-p-benzoquinona
ATK	araquidonil-trifluormetil-cetona
BSA	albumina bovina sérica
cAMP	monofosfato 3'5'-cíclico de adenosina
COX	ciclooxigenase
cPLA₂	fosfolipase A ₂ citosólica
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
H₇	1-(5-isoquinolinosulfonil)-2-(metilpiperazina)
HEPES	(N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[ácido 2-etanosulfônico]
HSA-I¹²⁵	albumina bovina marcada com iodo radioativo
HTAB	brometo de hexadeciltrimetilamônio
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
iPLA_{2s}	fosfolipase A ₂ independente de cálcio
L-NAME	N ^ω -nitro-L-arginina metil éster
LTB₄	leucotrieno B ₄
MPO	mieloperoxidase
MTT	[brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico]
NK₁	neurocinina-1
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
NO	óxido nítrico
PAF	fator de ativação plaquetária (1- <i>O</i> -alquil-2-acetil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina)
PCA4022	ácido metil 2-(feniltio)etil ester 1,4-diidro-2,4,6-trimetil-3,5-piridinodicarboxílico

PKC	proteína quinase C
PLA₂ <i>Nmm</i>	fosfolipase A ₂ do veneno de <i>Naja mocambique mocambique</i>
PLA₂	fosfolipase A ₂
RPMI-1640	meio de cultura para células
SDS	dodecilsulfato de sódio
sPLA₂	fosfolipase A ₂ secretória
SR140333	cloreto de ((S)-1-{2-[3-(3,4-diclorofenil)-1-(3-isopropoxifenilacetil) piperidina-3-il]etil}-4-fenil-1-azoniabencilo[2.2.2]octano
SNAREs	<i>soluble N-ethylmaleinide-sensitive fusion protein attachment protein receptors</i>
TNF-α	fator de necrose tumoral- α
VIP	polipeptídeo intestinal vasoativo

LISTA DE MATERIAIS

<u>Susbtância</u>	<u>Procedência</u>
AA861	Sigma (EUA)
Aminoguanidina	Sigma (EUA)
Azul de tripan	Sigma (EUA)
BSA	Sigma (EUA)
CaCl₂	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Celecoxib	Laboratórios Pfizer Ltd (São Paulo, Brasil)
Colagenase do tipo IV	Sigma (EUA)
Diidrocloreto de <i>o</i>-dianisidina	Sigma (EUA)
Fosfato de potássio	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Glicose	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
H₂O₂	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Halotano	Cristália Pr. Quím. Far. (Itapira, Brasil)
HEPES	Sigma (EUA)
HSA-I¹²⁵	IPEN/CNEN/USP (São Paulo, Brasil)
HTAB	Sigma (EUA)
Icatibant	Aventis Pharma (Alemanha)
Indometacina	Sigma (EUA)
Inibidor de tripsina	Sigma (EUA)
KCl	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Kit α-amilase	Laborlab (Guarulhos, Brasil)
Kit TNF-α de rato	Pharmigen (EUA)
L-NAME	Sigma (EUA)
MgCl₂	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
MTT	Sigma (EUA)

Susbtância

NaCl

NaHPO₄

PCA4248

Pentobarbital sódico

Pentoxifilina

PLA₂ *Nmm*

RPMI

SDS

SR140333

Tauracolato de sódio

Triton X-100

Procedência

Merck (Rio de Janeiro, Brasil)

Merck (Rio de Janeiro, Brasil)

Alexis (Reino Unido)

Cristália Pr. Quím. Far. (Itapira, Brasil)

Sigma (EUA)

Sigma (EUA)

Sigma (EUA)

Sigma (EUA)

Sanofi Research (França)

Sigma (EUA)

Sigma (EUA)

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Representação esquemática do pâncreas exócrino.....	26
Figura 2: Sítio de ação das PLA ₂ nos fosfolípidos de membrana.....	34
Figura 3: Curva dose resposta da pancreatite induzida pela injeção no ducto bilipancreático de piratoxina-I.....	51
Figura 4: Curva tempo resposta da pancreatite induzida pela injeção no ducto bilipancreático de piratoxina-I	52
Figura 5: Tecido pancreático de ratos submetidos à injeção no ducto biliopancreático de piratoxina-I	54
Figura 6: Tecido pulmonar de ratos submetidos à injeção no ducto biliopancreático de piratoxina-I	55
Figura 7: Efeito da injeção no ducto bilipancreático de piratoxina-I, bothropstoxina-II ou PLA ₂ <i>Naja mocambique mocambique</i>	58
Figura 8: Efeito da pentoxifilina, SR140333 e icatibant sobre os efeitos inflamatórios locais da pancreatite aguda induzida pela PLA ₂ do veneno de <i>Naja mocambique mocambique</i>	62
Figura 9: Efeito do L-NAME e da aminoguanidina sobre os eventos inflamatórios locais da pancreatite aguda induzida pela PLA ₂ do veneno de <i>Naja mocambique mocambique</i>	63
Figura 10: Efeito da inibição da indometacina, celecoxib, PCA4248 e AA861 sobre os eventos inflamatórios locais da pancreatite aguda induzida pela PLA ₂ do veneno de <i>Naja mocambique mocambique</i>	64

Figura 11: Efeito da pentoxifilina, SR140333, icatibant, L-NAME e aminoguanidina sobre o influxo de neutrófilos para o tecido pulmonar secundário a pancreatite aguda induzida pela PLA ₂ do veneno de <i>Naja mocambique mocambique</i>	66
Figura 12: Efeito da indometacina, celecoxib, PCA4248 e AA861 sobre o influxo de neutrófilos para o tecido pulmonar secundário a pancreatite aguda induzida pela PLA ₂ do veneno de <i>Naja mocambique moçambique</i>	67
Figura 13: Efeito da pentoxifilina, SR140333, icatibant, L-NAME e aminoguanidina sobre os níveis séricos de amilase durante a pancreatite aguda induzida pela PLA ₂ do veneno de <i>Naja mocambique mocambique</i>	68
Figura 14: Efeito da indometacina, celecoxib, PCA4248 e AA861 sobre os níveis séricos de amilase durante a pancreatite aguda induzida pela PLA ₂ do veneno de <i>Naja mocambique mocambique</i>	69
Figura 15: Efeito da pentoxifilina, SR140333, icatibant, L-NAME e aminoguanidina sobre os níveis séricos de TNF- α durante a pancreatite aguda induzida pela PLA ₂ do veneno de <i>Naja mocambique mocambique</i>	71
Figura 16: Efeito da indometacina, celecoxib, PCA4248 e AA861 sobre os níveis séricos de TNF- α durante a pancreatite aguda induzida pela PLA ₂ do veneno de <i>Naja mocambique mocambique</i>	72
 Tabela 1: Tratamentos com antagonistas e inibidores farmacológicos utilizados na pancreatite induzida por PLA ₂ de <i>Naja mocambique mocambique</i>	 45
Tabela 2: Liberação de amilase de ácinos pancreáticos e viabilidade celular após estimulação com as PLA ₂ s.....	60
Tabela 3: Resumo sobre os efeitos dos antagonistas/inibidores utilizados na pancreatite induzida por PLA ₂ do veneno de <i>Naja mocambique mocambique</i>	73

RESUMO

A pancreatite aguda é uma doença inflamatória do pâncreas caracterizada por intensa necrose pancreática e efeitos sistêmicos secundários como lesão pulmonar, os quais são a principal causa da mortalidade observada nessa doença. Há evidências de que as fosfolipases A₂ (PLA₂) têm um importante papel na fisiopatologia da pancreatite aguda. O objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade de PLA₂s de induzir pancreatite em ratos e os mecanismos envolvidos nesse fenômeno. As seguintes PLA₂s foram utilizadas: piratoxina-I (homólogo Lys-49 de PLA₂ desprovido de atividade catalítica), bothropstoxina-II (homólogo Asp-49 de PLA₂ com baixa atividade catalítica) e a PLA₂ proveniente do veneno de *Naja mocambique mocambique* (que possui alta atividade catalítica). Ratos Wistar machos (200-250 g) provenientes do CEMIB/UNICAMP foram utilizados. As PLA₂s foram injetadas no ducto biliopancreático de animais anestesiados e após diferentes tempos experimentais foram avaliados o extravasamento de proteínas plasmáticas no pâncreas, infiltrado de neutrófilos no pâncreas e pulmão e amilase sérica. A análise histológica do pâncreas e pulmão também foi realizada em alguns grupos experimentais. Piratoxina-I foi capaz de causar extravasamento de proteínas plasmáticas no pâncreas, infiltrado de neutrófilos no pulmão e os níveis séricos de amilase. Além disso, a piratoxina-I causou alterações histológicas nos tecidos pancreático (infiltrado de neutrófilos, necrose de células acinares e edema intersticial) e pulmonar (edema intersticial e diminuição do espaço alveolar), que foram mais evidentes nos tempos iniciais da pancreatite (4-12h). Bothropstoxina-II e a PLA₂ do veneno de *Naja mocambique moçambique*, à semelhança da Piratoxina-I, também foram capazes de aumentar o extravasamento de proteínas plasmáticas e o influxo de neutrófilos no tecido pancreático por mecanismos não relacionados à sua atividade catalítica. Entretanto, o influxo de neutrófilos para o pulmão e o aumento dos níveis séricos de amilase causados por essas PLA₂s foi dependente de sua atividade catalítica. As PLA₂s também causaram secreção de amilase de ácinos pancreáticos isolados, que foi dependente da atividade catalítica dessas

enzimas. Adicionalmente, com o objetivo de entender o mecanismo envolvido na pancreatite induzida pela PLA₂ de *Naja mocambique mocambique* animais foram tratados com os seguintes agentes farmacológicos: pentoxifilina (inibidor da síntese de TNF- α), SR140333 (antagonista de receptor NK₁), icatibant (antagonista de receptor B₂), L-NAME (inibidor não seletivo das NOS), aminoguanidina (inibidor preferencial da NOS induzível), indometacina (inibidor não seletivo de COX), celecoxib (inibidor seletivo de COX-2), PCA4248 (antagonista dos receptores de PAF) e AA861 (inibidor da 5-lipoxigenase). Em conjunto, nossos dados mostraram que os efeitos locais e secundários são multimediados, envolvendo a participação de bradicinina, substância P, NO, TNF- α , PAF e metabólitos das COXs. Em conclusão, demonstramos que as PLA₂s secretórias são capazes de induzir pancreatite aguda em ratos quando injetadas no ducto biliopancreático, um quadro caracterizado por efeitos inflamatórios locais e secundários cuja mediação farmacológica envolve vários fatores. Além disso, a pancreatite aguda induzida pelas PLA₂s reproduz algumas alterações observadas na pancreatite aguda em humanos, representando uma nova estratégia de estudo da fisiopatologia da pancreatite aguda.

ABSTRACT

Acute pancreatitis is an inflammatory disease of the pancreas that is characterized by intense pancreatic necrosis and remote systemic effects such as the lung injury that is the main cause of death during acute pancreatitis. There are evidences that phospholipases A₂ (PLA₂) have an important role in the acute pancreatitis pathophysiology. The aim of this work was to investigate the ability of PLA₂ to induce acute pancreatitis in rats, and the mechanisms underlying this phenomenon. The following PLA₂s were used: piratoxin-I (a Lys-49 PLA₂ homologue devoid of catalytic activity), bothropstoxin-II (an Asp-49 PLA₂ homologue with low catalytic activity) and PLA₂ from *Naja mocambique mocambique* venom (high catalytic activity). Male Wistar rats (200-250g) provided by CEMIB-UNICAMP have been used. The PLA₂s were injected into the common bile duct of anesthetized rats, after which pancreatic plasma protein extravasation, pancreatic and lung neutrophil infiltration and serum levels of amylase were measured. Histology of the pancreatic and lung tissue has also been carried out in some experimental group. Piratoxin-I was able to increase the pancreatic plasma protein extravasation, lung neutrophil infiltration and serum amylase levels. In addition, Piratoxin-I caused histological changes in the pancreatic (neutrophil infiltration, areas of acinar cell necrosis and interstitial edema) and lung (interstitial edema and diminution of alveolar space) tissues, which were more evident in the early periods (4-12h) after the injection. Bothropstoxin-II and PLA₂ from *Naja mocambique mocambique* venom were also able to increase the plasma protein extravasation and neutrophil influx in the pancreatic tissue by mechanisms unrelated to their catalytic activity. However, the remote lung neutrophil influx caused by these PLA₂s was shown to depend on their catalytic activity. The enhancement of serum amylase levels was also dependent on the catalytic activity of these enzymes. The PLA₂s also caused amylase secretion from isolated pancreatic acini, which was dependent on their catalytic activity. Next, in order to further understand the mechanisms involved in pancreatitis induced by PLA₂ *Naja mocambique mocambique*, animals were treated with the following

pharmacological agents: pentoxifylline (TNF- α synthesis inhibitor), SR140333 (NK₁ receptor antagonist), icatibant (B₂ receptor antagonist), L-NAME (non-selective NOS inhibitor), aminoguanidine (preferential inducible NOS inhibitor), indomethacin (non-selective COX inhibitor), celecoxib (selective COX-2 inhibitor), PCA4248 (PAF receptor antagonist) and AA861 (5-lipoxygenase inhibitor). Taken together our data showed that local and remote effects are multimediated, involving the participation of bradykinin, substance P, NO, TNF- α , PAF and COXs metabolites. In conclusion, we have shown that secretory PLA₂s are able to induce acute pancreatitis in rats when injected into the common bile duct. Therefore, PLA₂-induce acute pancreatitis reproduces some aspects of the human disorder representing a new strategy to study the pathophysiology of acute pancreatitis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pancreatite aguda

O pâncreas é uma glândula anexa mista (exócrina e endócrina) situada posteriormente ao estômago, em posição retroperitoneal, fixada à parede abdominal posterior. É um órgão inacessível à exame física e outras modalidades de avaliações clínicas diretas, devido à sua localização em relação à parede abdominal (Dangelo e Fattini, 1995). É constituído por dois tipos fundamentais de tecidos: (1) as ilhotas de Langerhans, porção endócrina do pâncreas, as quais secretam insulina e glucagon diretamente para o sangue; e (2) as células acinares, que representam a porção exócrina do pâncreas, responsável pela produção e secreção das enzimas digestivas.

O pâncreas exócrino é estruturalmente semelhante a um “cachos de uvas”, sua arquitetura contém túbulos que são cercados por células adjacentes com formato piramidal, as células acinares, levando à formação de estruturas chamadas de ácinos, como mostrado na Figura 1.

A função primária das células acinares é sintetizar e secretar enzimas hidrolíticas que alcançam o duodeno para cumprir seu papel digestivo. Cada ácino consiste de um pequeno agregado de células epiteliais secretórias formando um lúmen central, chamado de canalículo intercelular. As células acinares possuem duas porções distintas de membrana: a membrana basolateral, que é mais extensa e localizada na periferia acinar, e a membrana apical, que representa menos de 10% da área total da célula, estando voltada para o lúmen central. As células acinares pancreáticas são muito ricas em RNA, indicando intensa atividade de síntese protéica. Após a síntese nas respectivas formas de enzimas inativadas (proenzimas), essas deixam as cisternas do retículo endoplasmático granular e passam para o aparelho de Golgi onde são concentradas por eliminação de água, sob a forma de grânulos de secreção, denominados grânulos de zimogênio, que, por sua vez, estão concentrados na

região proximal à membrana apical da célula. Dessa forma, os ácinos liberam os conteúdos de seus grânulos secretórios nos ductos intralobulares, alcançando os ductos interlobulares, em seguida os extralobulares e finalmente os ductos pancreáticos acessório e principal (ducto coletor principal). Na sua terminação, o ducto pancreático acopla-se ao colédoco para desembocar no duodeno por um óstio comum, o esfíncter de Oddi (Sarles, 1977; Leung e Ip, 2006).

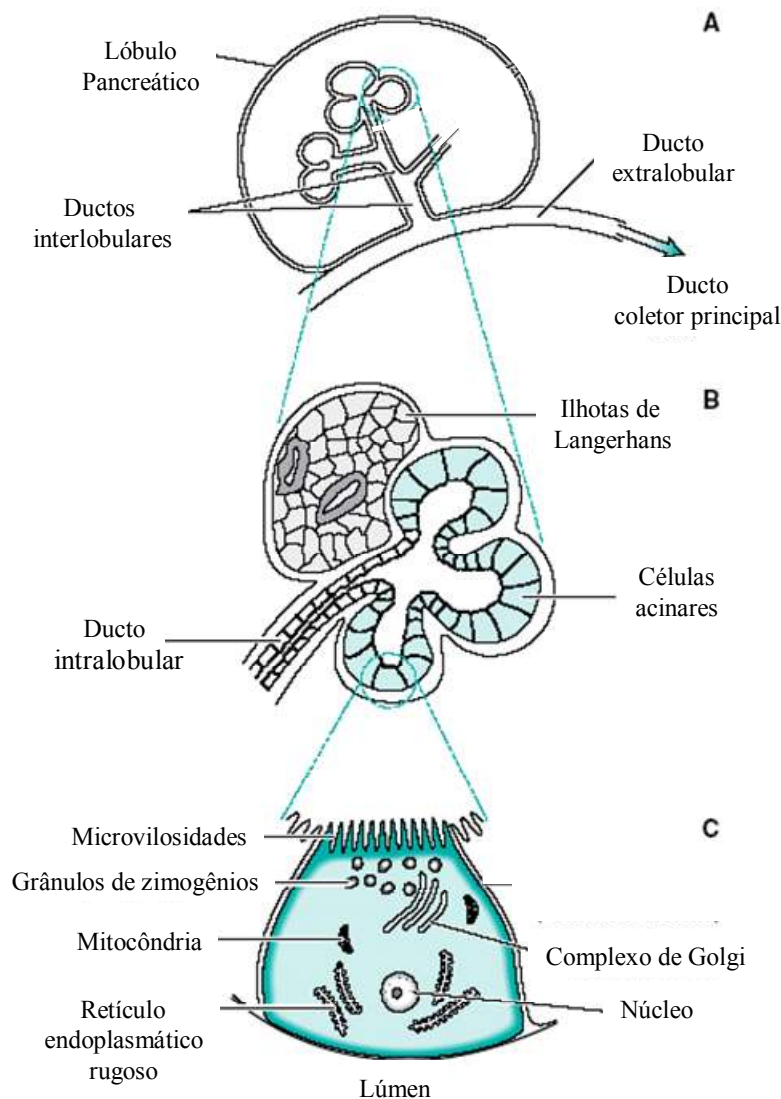


Figura 1: Representação esquemática do pâncreas exócrino. (A) Um lóbulo pancreático indicando o sistema de ductos, (B) a relação de uma unidade exócrina e uma ilha de Langerhans e (C) uma célula acinar. Adaptado de Smith & Morton, 2001.

O suco pancreático resultante é produzido principalmente em resposta à presença de quimo nas porções superiores do intestino delgado. O controle da secreção pancreática é feito principalmente por reguladores neuro-hormonais como colecistocinina (endócrino), acetilcolina e outros peptídeos incluindo secretina, polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e angiotensina II. As características do suco pancreático são determinadas, em grande parte, pelos tipos de alimento contidos no quimo. As principais enzimas digestivas encontradas no suco pancreático são a tripsina, quimiotripsina, carboxipolipeptidases, ribonucleases, desoxirribonucleases (enzimas proteolíticas), amilase pancreática, lipase pancreática, esterase e fosfolipases (Gardner, 1979). Conforme anteriormente citado, as enzimas proteolíticas encontram-se sob a forma de proenzimas inativas (tripsinogênio, quimiotripsinogênio, procarboxipolipeptidases) e não se tornam ativas antes de serem excretadas no intestino, pois podem digerir o próprio pâncreas. Assim, as mesmas células que secretam as enzimas proteolíticas no interior dos ácinos, secretam também outras substâncias, denominadas inibidores da tripsina. Estes são armazenados no citoplasma das células glandulares que circundam os grânulos de enzimas e previnem a ativação da tripsina tanto no interior das células secretoras quanto nos ductos do pâncreas. Contudo, na vigência de intensa lesão do pâncreas (ou quando o ducto se torna bloqueado), grandes quantidades de secreção pancreática armazenam-se nas áreas lesadas da glândula. Embora o pâncreas possua mecanismos capazes de prevenir a ativação intracelular de zimogênios e subsequente autodigestão, em condições de lesão pancreática, os mecanismos protetores são pouco eficientes; assim, as secreções pancreáticas tornam-se rapidamente ativas, podendo levar à digestão do pâncreas, originando a condição denominada pancreatite aguda (Grady e col. 1998; Saluja e col. 1999).

A pancreatite aguda é, portanto, uma doença inflamatória do pâncreas que envolve uma sequência complexa de eventos fisiopatológicos, muitos dos quais ainda desconhecidos. Essa doença desenvolve-se rapidamente, podendo levar a complicações fatais como insuficiência pulmonar, renal e circulatória (Bhatia e col., 2000). Dependendo da severidade e da duração, a pancreatite apresenta-se sob uma variedade de formas clínicas. Pode ser caracterizada como uma doença inflamatória moderada, autolimitada, com pouca necrose das células acinares; nesse caso, é classificada como pancreatite aguda edematosa. Em casos avançados, a pancreatite torna-se grave e algumas vezes fatal devido

à maciça necrose acinar e hemorragia pancreática, sendo, nesse caso, denominada pancreatite aguda hemorrágica necrosante. Além disso, vários episódios de pancreatite aguda podem levar a um quadro de pancreatite crônica, caracterizada por fortes dores abdominais e progressiva fibrose, conduzindo a insuficiência pancreática (Scarpelli e col., 1994).

Um evento inicial crítico dessa doença é a ativação intracelular de zimogênio pancreático, resultante de um processo autodigestivo do pâncreas, que determina uma inflamação aguda local e sistêmica; esta última pode desencadear a síndrome do desconforto respiratório do adulto (O'Donovan e col., 1995; Bhatia e col., 2000). A lesão pulmonar é o principal efeito secundário da pancreatite aguda relacionada à mortalidade dos pacientes. Essa mortalidade pode alcançar 25% dos pacientes com pancreatite hemorrágica; contudo, nos casos de pancreatite edematosa, essa mortalidade é menor do que 5% (Pitchumoni e col., 2005; Yadav e Lowenfels, 2006). Estima-se que aproximadamente 60% dos casos de morte durante a pancreatite aguda são devidos à falência pulmonar (Alves Junior e col., 1996, Renner e col., 1985).

Os mecanismos exatos pelos quais os diversos fatores etiológicos levam a uma doença extrapancreática ainda não estão bem esclarecidos, mas a lesão pulmonar tem sido atribuída à liberação, no sistema circulatório, de enzimas proteolíticas derivadas do pâncreas (O'Donovan e col., 1995). Sabe-se ainda que a lesão nas células acinares leva a uma resposta local, onde mediadores inflamatórios gerados localmente podem alcançar a circulação sanguínea resultando em uma resposta inflamatória sistêmica que também contribui para a severidade da doença. A ativação dos leucócitos pelas citocinas é uma consequência direta da resposta inflamatória sistêmica e em excesso leva à síndrome da disfunção orgânica múltipla (Wilson e col., 1998).

1.1.1. Ácinos pancreáticos estimulados *in vitro*

Dada a importância dos ácinos pancreáticos como células responsáveis pelos eventos iniciais críticos da pancreatite aguda, foram desenvolvidas técnicas para o estudo dos ácinos, ou mesmo de células acinares isoladas. Os trabalhos pioneiros que utilizaram a estimulação de células acinares ou ácinos isolados datam da década de 70 (Amsterdam e Jamieson, 1974a; Amsterdam e Jamieson, 1974b; Williams e col., 1976; Williams e col., 1978; Peikin e col., 1978). Todos esses trabalhos foram baseados na digestão do tecido

pancreático com collagenase, em meios como tampões Krebs e/ou HEPES, que contêm íons cálcio, sódio, cloreto, potássio, fosfato, além de glicose, albumina, suplementos de aminoácidos e inibidores de proteases (inibidores de tripsina e aprotinina dentre outros). Dessa maneira, esses autores descreveram técnicas para obtenção de células acinares ou ácidos isolados de pâncreas de cobaias, camundongos ou ratos. Também demonstraram que essas células são capazes de responder *in vitro* à estimulação com compostos que o fazem *in vivo*, como análogos de colecistocinina, agonistas colinérgicos (como acetilcolina ou carbacol), peptídios como VIP ou secretina, dentre outros compostos. Além disso, mostraram que os ácidos pancreáticos oferecem maior facilidade de manuseio, resultando em preparações que respondem com maior eficiência do que as células acinares isoladas.

Desde os trabalhos originais, vários outros artigos foram direcionados ao estudo de ácidos pancreáticos isolados. Atualmente, é descrito que a estimulação com acetilcolina ou colecistocinina ativa receptores localizados na membrana basolateral das células acinares, causando a geração de um sinal intracelular de Ca^{2+} , que por sua vez, desencadeia a fusão dos grânulos de zimogênios com a membrana apical, levando a secreção das enzimas. Essa fusão é mediada por proteínas receptoras conhecidas como SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors*), mecanismo que é desencadeado pelo Ca^{2+} , mas que não está totalmente elucidado. Nesse contexto, há o envolvimento das vias de sinalização de inositol trifosfato/diacilglicerol, que elevam a concentração de Ca^{2+} intracelular, ativam a proteína quinase C, com subsequente desencadeamento da exocitose dependente de Ca^{2+} . Já as vias de sinalização iniciadas pela secretina ou VIP na membrana basolateral são mediadas pelo aumento dos níveis do nucleotídeo AMPc e subsequente ativação da proteína quinase A, também levando à secreção dos grânulos de zimogênio (Williams, 2001; Wäsle e Edwardson, 2002). Tais mecanismos representam mecanismos fisiológicos para a secreção dos grânulos de zimogênio. O entendimento desses mecanismos pode ser valioso para a compreensão dos eventos intracelulares que desencadeiam a pancreatite aguda, visto que, nessa condição, a injúria e ruptura dos ácidos pancreáticos permitem a exposição das enzimas pancreáticas ao tecido e os subsequentes efeitos inflamatórios (Bhatia e col., 2005).

1.1.2. Modelos de pancreatite experimental

Para induzir a pancreatite aguda em animais, vários modelos experimentais foram descritos (Steer, 1999). Estes incluem:

(1) Indução através de uma dieta deficiente em colina e suplementada com metionina. Este modelo é mais utilizado em camundongos, onde a severidade da doença depende das proporções da dieta utilizada e de sua duração (Lombardi e col., 1975);

(2) Estimulação da secreção exócrina pancreática através da administração de análogos da colecistocinina, como a ceruleína. Este modelo causa pancreatite edematosa, caracterizada por hiperamilasemia, edema pancreático e vacuolização das células acinares, porém com baixas taxas de mortalidade (Lampel e Kern, 1977);

(3) Injeção retrógrada no ducto pancreático de bile, de sais biliares ou de enzimas digestivas ativadas. Isto produz pancreatite grave, rápida, com extensa lesão tecidual e com alta taxa de mortalidade (Aho e col., 1980);

(4) Obstrução do ducto pancreático, onde o fluxo da secreção exócrina pancreática é bloqueado mecanicamente levando à pancreatite moderada (Senninger e col., 1984, Samuel e col., 1994).

Além desses modelos outros também podem ser citados como a pancreatite induzida pela administração de L-arginina em altas doses (Mizunuma e cols., 1984; Drawra e cols., 2006) ou pela formação de complexos imunes (Jancar e cols., 1988).

1.1.3. Mediadores inflamatórios envolvidos na pancreatite aguda

Vários mediadores inflamatórios são gerados durante a inflamação local e sistêmica decorrente da pancreatite, tais como quimiocinas e citocinas, lípides derivados do metabolismo do ácido araquidônico, PAF, cininas, fatores neurogênicos e radicais livres; porém, o exato mecanismo pelo qual estes mediadores agem ainda é desconhecido (Bhatia e col., 2000; Satoh e col., 2000).

As ciclooxigenases (COXs) são as enzimas responsáveis pela geração dos metabólitos do ácido araquidônico. Duas formas dessas enzimas são descritas: (1) a COX-1, expressa de forma constitutiva, tendo importante papel fisiológico em muitos tecidos; e (2) a COX-2, que é expressa principalmente em condições inflamatórias, pois sua expressão pode ser regulada positivamente por estímulos pró-inflamatórios como as citocinas. O fato

das COXs, principalmente a COX-2, serem reguladas por fatores que alteram o curso da pancreatite, indica que essas enzimas são importantes para a indução e progressão da pancreatite. De fato, os níveis protéicos e de mRNA de COX-2 encontram-se aumentados durante a pancreatite em camundongos (Ethridge e col., 2002). Além disso, a inibição farmacológica ou a modificação genética da COX-2 é capaz de diminuir a severidade da pancreatite em camundongos (Song e col., 2002). Embora um efeito protetor produzido pela inibição da COX-2 tenha sido observado nesses trabalhos, Slogoff e col. (2004) demonstraram que a inibição da COX-2 em camundongos não altera o perfil de produção de IL-6 e IL-1 β no soro e no pâncreas desses animais.

Outra importante enzima que contribui para geração de mediadores lipídicos é a 5-lipoxigenase, que catalisa a formação dos leucotrienos a partir do ácido araquidônico. Os leucotrienos são sintetizados por leucócitos residentes ou recrutados durante processos inflamatórios. Essas moléculas agem via receptores de superfície de membrana acoplados à proteína G, desencadeando eventos sinalizadores intracelulares que levam ao acúmulo de leucócitos, aumento da capacidade fagocítica e microbicida pelos fagócitos e geração de outros mediadores pró-inflamatórios (Peters-Golden e col., 2005). Existem evidências de que os derivados da 5-lipoxigenase podem ter importante participação no desenvolvimento da pancreatite aguda, pois em camundongos deficientes de 5-lipoxigenase ou com o tratamento dos animais com inibidor dessa enzima observou-se atenuação da inflamação pancreática e pulmonar (Kiriya e col., 1993; Cuzzocrea e col., 2003).

Outro mediador dessa patogenia é o PAF, um derivado lipídico da ação das PLA₂, que atua via receptores específicos de superfície celular, localizados em numerosas células e tecidos, incluindo plaquetas, leucócitos e células endoteliais (Scholmerich, 1996). O PAF está envolvido em muitos eventos inflamatórios incluindo aumento da permeabilidade vascular e migração de neutrófilos (Formela e col., 1995). Quando injetado por via intravenosa ou intraperitoneal, o PAF induz um aumento, dose-dependente, na permeabilidade vascular no pâncreas e duodeno de ratos, podendo levar à pancreatite aguda (Sirois e col., 1988). Alguns trabalhos indicam que antagonistas dos receptores de PAF previnem muitos dos efeitos observados durante a pancreatite aguda experimental (Hotter e col., 1997, Rivera e col., 1998, Lane e col., 2001).

As cininas são importantes mediadores vasoativos derivados da ação de enzimas denominadas calicreínas. As calicreínas (tecidual ou plasmática) atuam sobre cininogênios de alto ou baixo peso molecular gerando as cininas (calidina e bradicinina). Estas, por sua vez, são degradadas pela ação de enzimas chamadas de cininases I e II. As cininas estão envolvidas em vários processos inflamatórios, causando principalmente aumento da permeabilidade vascular e da formação de edema. A bradicinina tem maior importância em processos inflamatórios, como é o caso da pancreatite. Esta cinina age preferencialmente via ativação de receptores acoplados à proteína G, denominados receptores B₂. Na pancreatite aguda vários autores relataram efeitos benéficos da inibição farmacológica do receptor B₂ (Lerch e col., 1995, Griesbacher & Lembeck, 1992, Griesbacher e col., 1995) ou inibição das calicreínas (Griesbacher e col., 2002). Além disso, Hirata e col. (2002) demonstraram que ratos geneticamente modificados, que não expressam o receptor B₂, apresentam melhora no quadro de pancreatite. Esses trabalhos apontam para um papel importante desses mediadores vasoativos na pancreatite, primordialmente pelo aumento do edema pancreático.

A substância P é um neuropeptídeo pertencente à família das taquicininas, sendo sintetizada e liberada de terminações nervosas sensoriais. Essa substância atua, preferencialmente, através de receptores de neurocinina-1 (NK₁) de membranas nas células efectoras, aumentando a permeabilidade microvascular e promovendo extravasamento de proteínas plasmáticas do espaço intravascular para o espaço extravascular, com subsequente formação de edema. Foram encontrados níveis pancreáticos elevados de substância P e expressão aumentada de receptores NK₁ em células acinares durante a pancreatite aguda experimental (Patto e col., 1992; Bhatia e col., 1998). Em camundongos geneticamente modificados, desprovidos de receptores NK₁, demonstrou-se uma redução na severidade da pancreatite e da injúria pulmonar associada à mesma, indicando que a substância P, através destes receptores, é um importante mediador da pancreatite aguda e injúria pulmonar (Bhatia e col., 1998, Maa e col., 2000). Além disso, a pancreatite pode ser inibida ou atenuada por antagonistas do receptor NK₁ (Grady e col., 2000, Lau e col., 2005).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre altamente reativo, sintetizado a partir de um grupamento guanidina do substrato L-arginina por uma família de isoenzimas,

chamadas óxido nítrico sintases (NOS; Moncada e col., 1993). Dois grandes grupos destas enzimas são identificados: as constitutivas (cNOS) e a induzível (iNOS) (Davies e col., 1995). A produção excessiva de NO acarreta vasodilatação e inibição da ativação de leucócitos, da agregação plaquetária e da adesão (Kubes e col., 1991; Gaboury e col., 1993). O papel do NO na pancreatite aguda não está totalmente esclarecido e os trabalhos ainda apontam divergências entre si. Dentre as evidências de um papel protetor do NO na pancreatite está a demonstração de que doadores de NO possuem efeitos benéficos sobre a pancreatite aguda, particularmente sobre a formação de edema pancreático, secreção de amilase e ativação de tripsinogênio pancreático (Werner e col., 1997). Além disso, estudos *in vitro* têm demonstrado que o NO reduz a aderência neutrofílica às células endoteliais, diminuindo a produção de ânion superóxido (Clancy e col., 1992; Kubes e col., 1991). Assim, o efeito benéfico do NO na pancreatite aguda parece ser decorrente de redução da adesão leucocitária e subsequente infiltrado tecidual e aumento do fluxo da microcirculação pancreática e oxigenação tecidual. De fato, a inibição da síntese de NO por compostos tais como o L-NAME exacerba a injúria pulmonar associada à pancreatite aguda, que se traduz por um quadro de extravasamento microvascular e edema, associados a intenso infiltrado neutrofílico (O'Donovan e col., 1995; Werner e col., 1998). Contrariamente, diversos trabalhos sugerem efeitos deletérios na presença de NO em quadro de pancreatite, na medida em que mostram que camundongos deficientes de iNOS apresentam redução da pancreatite (Cuzzocrea e col., 2002), que a inibição da iNOS reduz a injúria do pâncreas (Um e col., 2003) e que a ativação da iNOS correlaciona-se positivamente com a lesão pancreática e pulmonar (Leindler e col., 2004).

Citocinas também têm importante função no desenvolvimento da pancreatite aguda. Dentre elas, destacam-se as interleucinas (IL) 1 β , IL-6 ou IL-8 e o fator- α de necrose tumoral (TNF- α) que têm função pró-inflamatória (Baggiolini e col., 1989; Leser e col., 1991; Gross e col., 1992, Norman J., 1998), e a IL-10 com função antiinflamatória capaz de modular negativamente a liberação das citocinas pró-inflamatórias (Rongione e col., 1997). Norman e col. (1995a) mostraram que os níveis de IL-1, IL-6 e TNF- α estão elevados no soro de camundongos submetidos à pancreatite induzida pela ceruleína a partir da primeira hora após a indução. Segundo esses autores, os níveis séricos destas citocinas correlacionam-se com o grau da inflamação pancreática. Essas citocinas podem ser

produzidas pelas células acinares do pâncreas, pelos leucócitos circulantes e também por outros órgãos comprometidos secundariamente pelos efeitos locais no pâncreas, como o pulmão (Norman e col., 1997; De Dios e col., 2002; Blinman e col., 2000; Ramudo e col., 2005).

1.2. FOSFOLIPASES A₂ (PLA₂)

1.2.1. Aspectos estruturais, classificação e funções das PLA₂

As PLA₂s, também conhecidas por fosfatidil-acil-hidrolases (EC 3.1.1.4), são enzimas lipolíticas que agem especificamente na catálise da hidrólise da ligação éster na posição 2-acil (sn-2) dos L-fosfolipídeos presentes nas membranas celulares (Figura 2).

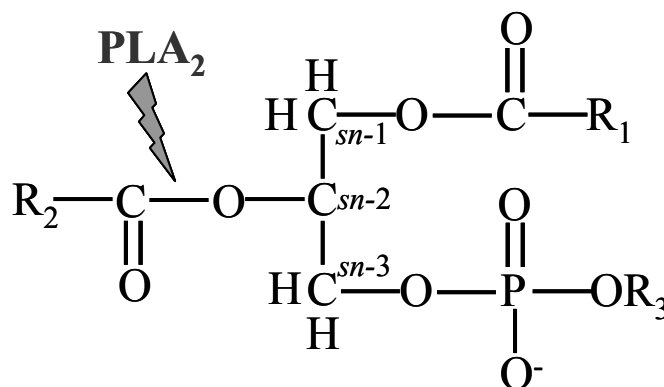


Figura 2: Sítio de ação das PLA₂ nos fosfolipídeos de membrana. Essas enzimas agem catalisando a clivagem do resíduo de ácido graxo na posição sn-2. Em R₁ são encontrados ácidos graxos saturados (frequentemente C₁₆ e C₁₈), em R₂ são encontrados predominantemente ácidos graxos insaturados (principalmente C_{20,4}) e em R₃ é encontrado um grupo cabeça polar como colina, etanolamina ou inositol.

A reação hidrolítica catalisada pela PLA₂ é dependente de cálcio e proporciona a liberação de ácidos graxos e lisofosfolipídeos. Os resíduos que participam da alça de ligação para os íons Ca²⁺ nas PLA₂s são Tyr-28, Gly-30, Gly-32 e Asp-49. A unidade catalítica é formada por His-48, Asp-49 e uma molécula de água (Fremont e col., 1993). A

modificação química do resíduo His-48 pelo agente brometo de *p*-bromofenacil resulta na inativação da enzima.

As PLA₂s apresentam alta homologia seqüencial e estrutural e estão evolutivamente relacionadas (Davidson e Dennis, 1990). Podem ser divididas em dois grupos: as extracelulares, de baixo peso molecular (14-18 kDa), também denominadas fosfolipases pancreáticas ou secretadas (sPLA₂s); e as intracelulares, de alto peso molecular (31-110 kDa), também denominadas fosfolipases citosólicas (cPLA₂s).

Inicialmente, as sPLA₂s foram divididas em três grandes grupos com base na localização celular, seqüência de aminoácidos, massa molecular, presença de pontes dissulfídicas intramoleculares e necessidade de cálcio para a atividade enzimática (Heinrikson e col., 1977; Davidson e Dennis, 1990, Rizzo e col., 2000). À medida que foram sendo descobertas novas PLA₂s, essa classificação ficou obsoleta. Six e Dennis (2000) propuseram uma classificação mais promenorizada para as PLA₂s, dividindo-as em 11 grupos (I-XI), conforme detalhado a seguir.

O grupo I compreende as PLA₂s provenientes dos venenos de serpentes das famílias *Elapidae* e *Hydrophidae* e de pâncreas de mamíferos. O grupo II compreende as PLA₂s dos venenos de *Crotalidae* e *Viperidae* e do fluido sinovial humano e plaquetas (Murakami e col., 1995). O grupo III compreende as PLA₂s provenientes de veneno de abelhas e do lagarto do gênero *Heloperma*. As cPLA₂s foram isoladas inicialmente do citosol de plaquetas e monócitos e expressam sua atividade catalítica na presença de concentrações micromolares de cálcio ou na presença de fosfatidil inositol 4-5-bifosfato (Dennis, 1994; Mosior e col., 1998) sendo classificadas como enzimas do grupo IV. O grupo V está representado pelas sPLA₂s encontradas em tecidos de mamíferos (14 kDa), especialmente em resposta à estímulos inflamatórios; o grupo VI é representado por PLA₂s independentes de cálcio (iPLA₂, 85 kDa); os grupos VII e VIII compreendem enzimas denominadas PAF acetil-hidrolases *a* e *b* respectivamente (45 kDa), sendo encontradas na circulação sanguínea da maioria dos animais e no cérebro de bovinos; o grupo IX é constituído de sPLA₂s isoladas de veneno de caramujo marinho também denominadas de conodipina M; o grupo X compreende sPLA₂s encontradas em leucócitos, fígado, timo e células endoteliais alveolares; e finalmente, o grupo XI é constituído pelas sPLA₂s de plantas (Six e Dennis, 2000). Posteriormente, também foram descritos os grupos XII,

constituído por sPLA₂ distribuída em vários tecidos como coração, fígado e músculo esquelético (Gelb e col., 2000), e XIII, presentes no capsídeo de parvovírus (Cannan e col., 2004).

As PLA₂s são enzimas importantes na sinalização celular, pois são capazes de lisar fosfolipídeos de membrana, liberando o ácido araquidônico que, através da ação das COXs, é metabolizado nos endoperóxidos cíclicos, que, por sua vez, levam à formação das prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos. O ácido araquidônico também pode ser metabolizado pela via da 5-lipoxigenase, formando os leucotrienos (Flower e Blackwell, 1976).

Através da ação das PLA₂s sobre fosfolipídeos de membrana contendo colina pode ser formado o PAF (1-*O*-alquil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfocolina), reação que ocorre em duas etapas tendo como intermediário o liso-PAF (1-*O*-alquil-2-lisoglicero-3-fosfocolina) (Snyder, 1989). A produção desses mediadores lipídicos proinflamatórios faz dessas enzimas um importante alvo terapêutico para o tratamento das doenças inflamatórias.

1.2.2. Atividade inflamatória de PLA₂s administradas exogenamente

Para o estudo do papel das PLA₂s no processo inflamatório, PLA₂s exógenas provenientes de venenos (ofídicos e de abelhas), e de pâncreas de mamíferos são amplamente utilizadas, pois apresentam grande homologia com a PLA₂ endógena, sendo capazes de reproduzir vários dos efeitos observados no processo inflamatório (Dennis 1994, Gutierrez e Lomonte, 1995). Essa capacidade foi primeiramente descrita quando se observou que sPLA₂s derivadas de venenos ofídicos provocavam edema de pata de rato (Brain e col., 1977) e desgranulação de mastócitos *in vivo* (Damerau e col., 1975). A partir daí desenvolveram-se vários trabalhos mostrando que a administração de diferentes sPLA₂s ofídicas em animais *in vivo* leva a efeitos inflamatórios locais caracterizados principalmente pelo aumento da permeabilidade vascular e formação de edema. Esses estudos foram impulsionados quando Vadas e col., em 1985, descreveram uma PLA₂ humana extracelular não pancreática em fluidos de articulações artríticas.

Uma preocupação constante em muitos trabalhos é esclarecer se a atividade edematogênica descrita para essas sPLA₂s estava relacionada com a atividade catalítica das mesmas. Em 1987, Vishwanath e col. sugeriram a existência de dois sítios distintos que seriam responsáveis, de maneira independente, pelas ações catalítica e farmacológica.

Cirino e col. (1989) demonstraram que sPLA₂s dos venenos de *Naja mocambique mocambique*, *Vipera russeli*, *Apis melifera* e sPLA₂ pancreática porcina apresentavam atividade edematogênica devido à ativação de mastócitos, mas que isto não estava diretamente relacionado com a atividade catalítica dessas sPLA₂. Outros resultados foram obtidos com outras sPLA₂s, concordando ou não com essas prerrogativas; e, dada a variedade de efeitos observados com as diferentes sPLA₂s e também ao fato de que muitos desses efeitos não se relacionavam com a atividade catalítica, Kini e Evans (1989) sugeriram a existência de sítios alvos nas membranas (receptores) para diferentes sPLA₂s, o que foi comprovado em vários tipos celulares (Hanasaki e col., 1992). Posteriormente, foram identificados e classificados dois tipos desses receptores: N (neuronal) e M (muscular) (Lambeau e Lazdunski, 1999).

Além disso, Wang e Teng (1990) demonstraram que sPLA₂s básicas (do veneno de *Trimeresurus mucrosquamatus*) são farmacologicamente mais potentes que as ácidas (do veneno de *Naja naja*). Neste estudo, o poliânion heparina suprimiu os efeitos da PLA₂ básica, enquanto que a inativação da atividade enzimática pelo brometo de *p*-bromofenacil inibiu os efeitos de ambas PLA₂s. Assim, esses autores sugeriram que as sPLA₂s podem induzir efeitos pró-inflamatórios por pelo menos três mecanismos diferentes: atividade enzimática, quantidade de sítios positivos e presença de um sítio farmacológico com participação de resíduos positivos.

As sPLA₂s provenientes de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, podem ser divididas em PLA₂s Asp-49 e Lys-49, sendo que as formas Asp-49, contêm um resíduo de ácido aspártico no sítio de ligação ao cálcio e possuem alta atividade enzimática, enquanto que as formas com um resíduo de lisina na posição 49, têm baixa ou nenhuma atividade enzimática, indicando que a presença de um resíduo de ácido aspártico nesta posição é essencial para a ligação ao cálcio e assim, para a atividade catalítica (van den Bergh e col., 1989).

sPLA₂s isoladas dos venenos de *Bothrops jararacussu*, chamadas de bothropstoxinas I (destituída de atividade fosfolipásica) e II (com atividade fosfolipásica residual) aumentam marcadamente a permeabilidade vascular em ratos por mecanismo dependente de desgranulação de mastócitos (Landucci e col., 1998). O mesmo foi observado para a piratoxina I (proveniente do veneno de *Bothrops pirajai*), também

destituída de atividade fosfolipásica (Landucci e col., 2000). Também foi demonstrado que essas PLA₂s promovem infiltração de leucócitos para a cavidade pleural de ratos através de mecanismos não relacionados à ativação de mastócitos pleurais ou à atividade enzimática dessas enzimas (Castro e col., 2000). Além disso, Gambero e col. (2002) examinaram a habilidade dessas PLA₂s e daquelas provenientes dos venenos de *Apis mellifera* e *Naja mocambique mocambique* em induzir quimiotaxia de neutrófilos. Esses autores verificaram que as mesmas são capazes de atrair neutrófilos humanos *in vitro* por um mecanismo independente da atividade fosfolipásica, envolvendo interações destas proteínas com os sítios de ligação para heparina/heparan na superfície celular, levando à liberação de leucotrieno B₄ (LTB₄) e PAF. O uso de inibidores de proteína quinase C (staurosporina e H₇), da proteína G (toxina Pertussis) e de cPLA₂ endógenas (ATK e bromoenol lactona) indicou que a sinalização intracelular no neutrófilo ocorre sequencialmente através da ativação da proteína G, PKC e iPLA₂, sendo esta última, possivelmente, a responsável pela liberação intracelular de ácido araquidônico e geração de LTB₄ e PAF (Gambero e col., 2004).

1.2.3. Papel das PLA₂s na pancreatite aguda

As PLA₂s circulantes desempenham um importante papel em condições patológicas, incluindo a pancreatite, onde as alterações necróticas correlacionam-se com os níveis de PLA₂ (Schmidt e Creutzfeldt, 1969, Schröder e col., 1980). A atividade catalítica da PLA₂ no soro de pacientes com pancreatite aguda relaciona-se diretamente com a severidade da doença e está muito aumentada nas formas mais graves (Büchler e cols., 1989; Formela e col., 1995). Duas isoformas de PLA₂ mostraram-se aumentadas no soro dos pacientes com pancreatite, tendo sido classificadas como pertencentes aos grupos I e II, respectivamente, de origem pancreática (secretada pelas células acinares) e não pancreática (provenientes de macrófagos, neutrófilos, plaquetas e fluido sinovial humano) (Anderson e col., 1994). A atividade catalítica e a patogênese da necrose do pâncreas, além dos efeitos sistêmicos como a lesão pulmonar, são atribuídos à PLA₂ não pancreática, embora a PLA₂ pancreática esteja também aumentada no plasma, circulando como uma enzima inativa. A origem celular da PLA₂ não pancreática (grupo II) ainda é desconhecida (Yoshikawa e col., 1999, Hietaranta e col., 1999).

Vários inibidores de PLA₂s vêm sendo desenvolvidos com a expectativa de que possam ser utilizados clinicamente para o tratamento de doenças inflamatórias como a pancreatite. Yoshikawa e col. (1999) demonstraram que o tratamento com S5920/LY3159820Na, um inibidor de sPLA₂ derivado do indol (Draheim e col., 1996), aumenta significativamente a sobrevivência dos animais submetidos à pancreatite aguda induzida pela infusão de uma mistura de tripsina/tauracolado de sódio no ducto biliopancreático. Além disso, nos mesmos animais tratados com este inibidor, os níveis de amilase e de lipase, bem como a atividade catalítica da PLA₂, encontravam-se diminuídos. Furue e col. (2001) mostraram que esse mesmo inibidor diminui a disfunção pulmonar (causada pela administração intratraqueal de ácido oléico) em coelhos, via proteção do surfactante pulmonar.

Uhl e col. (1998) avaliaram o efeito de um inibidor de PLA₂ de baixo peso molecular (BM 16,2056) sobre a pancreatite induzida por ceruleína ou tauracolato em ratos e demonstraram que esse inibidor diminui a atividade catalítica da PLA₂, a lesão tecidual e a injúria das células acinares.

Também foi demonstrado que a PLA₂ induz liberação de NO de macrófagos alveolares, contribuindo para a lesão pulmonar secundária à pancreatite aguda em ratos, sendo essa lesão prevenida pela quinacrina, um inibidor de PLA₂ (Tsukahara e col., 1999).

Schevitz e col. (1995) desenvolveram um potente inibidor de sPLA₂, o LY311727 (ácido 3-[3-acetamida-1-benzil-2-etilindolil-5-oxipropano fosfônico). Em camundongos transgênicos que expressam níveis elevados de sPLA₂ humana não pancreática, observou-se que esse composto suprime os níveis de sPLA₂ circulantes de maneira dose-dependente, sugerindo que o mesmo possa interagir especificamente com o domínio catalítico da sPLA₂ (Fox e col., 1996).

Os dados indicando que pacientes com pancreatite aguda têm níveis elevados de PLA₂ circulantes, aliados à capacidade na produção de mediadores proinflamatórios por essas enzimas reforçam a hipótese de que as PLA₂s são importantes para a fisiopatologia da pancreatite aguda e viabilizam o estudo da capacidade dessas enzimas em induzir a pancreatite *per se*.

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste trabalho foram investigar a capacidade das PLA₂s secretórias de induzir pancreatite aguda em ratos, bem como os mecanismos farmacológicos envolvidos.

Os objetivos específicos foram:

- i) Caracterizar a pancreatite induzida por PLA₂s de venenos ofídicos, curvas dose e tempo respostas e análise histológica.
- ii) Comparar PLA₂s com diferentes atividades catalíticas quanto à capacidade em induzir pancreatite aguda e estimular ácidos pancreáticos isolados.
- iii) Investigar a participação da substância P, da bradicinina, do PAF, do NO, dos mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico e do TNF- α na pancreatite induzida pelas PLA₂s.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos adultos, da espécie Wistar (200-250 g), provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum* e, dependendo do protocolo experimental, os mesmos foram mantidos conscientes ou anestesiados de forma apropriada com pentobarbital sódico ou halotano. Os protocolos experimentais foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA - IB/UNICAMP) sob o protocolo nº 573-1

3.2. Obtenção da piratoxina-I e da bothropstoxina-II

A piratoxina-I e a bothropstoxina-II foram purificadas de acordo com estudos prévios (Honsi-Brandeburgo e col., 1988; Mancuso e col., 1995). A piratoxina-I foi cedida pela Dra. Adélia C. Cintra da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e a bothropstoxina-II pelo Prof. Dr. José R. Giglio, da Faculdade de Medicina, ambos da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto (SP).

3.3. Indução e caracterização da pancreatite aguda

3.3.1. Indução da pancreatite

Ratos machos foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg) pela via intraperitoneal (i.p.) e submetidos a uma laparotomia mediana através da qual o ducto

pancreático foi cuidadosamente cateterizado via transduodenal com um tubo de polietileno de 1 mm de diâmetro externo, de acordo com o método descrito por Storck (1971). Em seguida, foram infundidos 0,3 mL de salina (0,9%), piratoxina-I (100-1000 µg/kg), bothropstoxina-II (300 µg/kg) ou PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique* (300 µg/kg) sob um fluxo constante durante de 60 segundos. Foi empregado como controle positivo o tauracolato de sódio (5%). A porção hepática do ducto foi previamente clampeada com uma pinça hemostática, antes da infusão, para evitar refluxo para o fígado. Os animais foram sacrificados após um período de 4 a 96 h após a indução da pancreatite, dependendo do protocolo experimental.

A pancreatite foi estudada quanto à presença de (i) edema pancreático, (ii) infiltrado neutrofílico pancreático (iii) infiltrado neutrofílico pulmonar, (iv) elevação da amilase sérica e (v) análise morfológica do pâncreas e pulmão.

Em experimentos envolvendo a piratoxina-I, foram feitas curvas de dose e de tempo, nas quais foram avaliados o extravasamento de proteínas plasmáticas, a atividade de mieloperoxidase no pulmão, a elevação da amilase sérica e análise histológica (apenas para curva de tempo). Nos experimentos de curva de tempo, os animais foram sacrificados nos tempos de 4, 8, 12, 24, 48 e 96 h após a indução da pancreatite. Nos experimentos de curva de dose, os animais foram injetados com doses variando entre 100 e 1000 µg/kg.

Nos experimentos envolvendo tratamentos com inibidores ou antagonistas farmacológicos foi utilizada a PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique* (300 µg/kg) e adicionalmente foi medido os níveis de TNF-α.

3.3.2. Medida do edema pancreático

A quantidade de edema pancreático foi avaliada em função do acúmulo local de HSA-I¹²⁵ (2,5 µCi/kg), previamente administrada pela via endovenosa peniana (Brain e Williams, 1985). Após o período de indução da pancreatite, uma amostra de 5 ml de sangue foi coletada desses animais, através da aorta abdominal. Em seguida, o animal foi morto por exsanguinação, o pâncreas removido e a radioatividade presente nas amostras de sangue e de tecido quantificada em contador gama. O edema formado foi expresso como volume de plasma extravasado em função da contagem obtida em 1 ml de plasma.

3.3.3. Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO) no pâncreas e pulmão

Amostras de pâncreas e pulmão dos animais foram coletadas, pesadas e cortadas em pedaços pequenos e mantidas em tubos teste na presença de 100 µl de tampão fosfato (50 mM, pH 6,0 contendo 0,5% de HTAB). Cada amostra foi homogeneizada durante 15 segundos, e alíquotas de 1 ml do homogenato foram centrifugadas por 2 min à 14000 rpm em centrífuga de Eppendorf. Os sobrenadantes obtidos foram submetidos à análise da atividade da MPO, conforme descrito a seguir. Em uma placa de 96 poços, 10 µl de sobrenadante foram adicionados a 200 µl de solução de diidrocloreto de *o*-dianisidina (0,167 mg/ml, preparada em tampão fosfato de potássio 50 mM contendo 0,005% de H₂O₂). As alterações nos valores de absorbância a 460 nm foram registradas em intervalos de 30 s durante 10 min. Os resultados foram expressos como unidades de MPO (UMPO) por mg de tecido. Uma UMPO foi considerada como a quantidade de enzima que degrada 1 µmol de peróxido/min (Bradley e cols., 1982).

3.3.4. Determinação de amilase sérica

A concentração de α -amilase no soro foi avaliada para cada grupo experimental utilizando-se kit comercial para a dosagem de α -amilase, conforme indicação do fabricante (LaborLab, Guarulhos, SP, Brasil). Esse método baseia-se na hidrólise de um substrato específico (2-cloro-4-nitrofenil-galacto piranosil maltodiose) pela enzima α -amilase, produzindo o cloronitrofenol, que absorve em 405 nm. A atividade da enzima é diretamente proporcional à velocidade de aparecimento da cor.

3.3.5. Determinação do TNF- α no soro

A concentração do TNF- α foi determinada no soro dos animais dos grupos salina e PLA₂ *Naja mocambique mocambique* tratados com os inibidores ou antagonistas através de kit comercial, segundo as instruções do fabricante (Pharmigen, EUA).

3.3.6. Preparação do pâncreas e pulmão para estudos histológicos

Os animais submetidos à pancreatite induzida por piratoxina-I (300 µg/kg) foram anestesiados e exsanguinados por secção da aorta abdominal e da veia cava inferior. O pâncreas e pulmão foram retirados, fixados por imersão em solução a 4% de paraformaldeído e incluídos em parafina. Cortes de 5 µm foram obtidos e corados por azul de touidina 0,025%, hematoxilina-eosina e/ou picrossirus. Os tecidos foram avaliados quanto à presença de necrose tecidual, abscesso intraparenquimatoso, infiltrado de leucócitos polimorfonucleares e edema intraparenquimatoso.

3.3.7. Tratamentos com antagonistas e inibidores farmacológicos

Para investigação do mecanismo envolvido na indução da pancreatite pela PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique* foram utilizados os inibidores ou antagonistas farmacológicos de acordo com a tabela 1:

Tabela 1: Tratamentos com antagonistas e inibidores farmacológicos utilizados na pancreatite induzida por PLA₂ de *Naja mocambique mocambique*:

Tratamento farmacológico	Dose	Via/ tempo de administração	Referência
AA861 (inibidor da lipoxigenase)	0,2 mg/kg	i.v./ 15 min antes da indução	Filiatre e cols., 2001
Aminoguanidina (inibidor preferencial de iNOS)	50 mg/kg	i.v. / imediatamente antes da indução	Vaquero e cols., 1998
Celecoxib (inibidor seletivo da COX-2):	20 mg/kg	i.v./ 1 h antes da indução	Song e cols., 2002
Icatibant (Hoe140; antagonista do receptor B ₂)	100 nmol/kg	s.c./ 30 min antes e 1 h após a indução	Hirata e cols., 2002
Indometacina (inibidor não seletivo da COX)	5 mg/kg	i.p./ 1 h antes da indução	Oruc e cols., 2004
L-NAME (inibidor da síntese de NO)	20 mg/kg	i.v./ imediatamente antes da indução	Franco-Penteado e cols., 2001
PCA4022 (antagonista do receptor de PAF)	5 mg/kg	i.v./ 1 h antes da indução	Filiatre e cols., 2001
Pentoxifilina (inibidor da síntese de TNF- α)	100 mg/kg	i.v./ 1 h antes da indução	Yee e cols., 2002
SR140333 (antagonista do receptor NK ₁)	120 nmol/kg	i.v./ 15 min antes e s.c., imediatamente após a indução	Costa e cols., 2001

3.4. Estimulação de ácidos pancreáticos *in vitro*

3.4.1. Obtenção dos ácidos pancreáticos isolados

Os animais foram anestesiados com halotano e submetidos à exsanguinação. Após laparotomia, o ducto biliopancreático foi cateterizado na porção hepática e a porção duodenal foi clampeada para permitir a injeção do tampão de digestão no tecido pancreático. Essa injeção, feita manualmente, expandiu o pâncreas, auxiliando para o processo de digestão do tecido. Foi injetado no pâncreas 5 mL de solução tampão Krebs-Ringer (NaCl 140 mM; KCl 4,7 mM; NaHPO₄ 1 mM; MgCl₂ 1,13 mM; CaCl₂ 1,28 mM; glicose 11,1 mM; pH 7,4) suplementado (BSA 0,5%) contendo collagenase do tipo IV (0,1 mg/mL). O tecido foi rapidamente coletado, picotado em uma placa de Petri e incubado a 37°C por 30 min. Após esse período, a preparação foi homogeneizada cuidadosamente através de pipetas de poros decrescentes. Os ácidos pancreáticos foram então lavados duas vezes com 5 mL de tampão Krebs-Ringer suplementado. Os ácidos foram então colocados em 10 mL de uma solução de BSA (4%), para purificar a preparação retirando restos celulares. Em seguida, a suspensão de ácidos foi novamente lavada (5 mL x 2) tampão HEPES (HEPES 10 mM; NaCl 140 mM; KCl 4,7 mM; NaHPO₄ 1 mM; MgCl₂ 1,13 mM; CaCl₂ 1,28 mM; glicose 11,1 mM; pH 7,4) suplementado (BSA 0,5%; inibidor de tripsina 0,1 mg/mL; RPMI). A suspensão final de ácidos pancreáticos provenientes de 1 pâncreas conteve aproximadamente 10 mL. Ao longo do processo de digestão, a viabilidade foi acompanhada através da incubação de alíquotas dos ácidos com azul de tripan.

3.4.2. Estimulação dos ácidos pancreáticos com as PLA₂s

Para estimulação *in vitro*, a suspensão de ácidos foi distribuída em placa de 24 poços (200 µL/poço). Foram adicionados 700 µL do tampão HEPES suplementado, realizando-se pré-incubação à 37°C por 10 min. Em seguida, 100 µL das soluções dos estímulos (PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique*, piratoxina-I, bothropstoxina-II, carbacol e ceruleína em diferentes concentrações) foram adicionados às placas e incubados por 1 h. Nos poços controle foi adicionado 100 µL de tampão HEPES. Após a incubação, alíquotas do sobrenadante foram coletadas para dosagem de amilase. Ao

precipitado, foi adicionado triton X-100 de maneira a atingir concentração final de 1%. As suspensões restantes foram transferidas para Eppendorfs, agitadas durante 20 segundos e centrifugadas em centrífuga de eppendorf a 14.000 rpm para lisar os ácidos. No sobrenadante dos ácidos lisados também foram realizadas dosagens de amilase, sendo este resultado considerado o total de amilase. A liberação de amilase pelos ácidos pancreáticos foi expressa como percentual em relação ao total.

3.4.3. Ensaio de atividade celular pelo MTT

O método de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico] foi originalmente descrito por Mosmann (1983) e pode ser utilizado para medir citotoxicidade, proliferação e ativação celular. É um ensaio colorimétrico que se baseia na redução do MTT pelas desidrogenases mitocondriais de células vivas. A reação produz o sal formazan que é pouco solúvel em água, porém mais solúvel em solventes orgânicos.

Este ensaio foi adaptado para os ácidos pancreáticos a partir da descrição feita por Kazanjian e col. (2003). Os ácidos pancreáticos foram distribuídos em placa de 96 poços (20 µL/poço), após o qual adicionou-se 70 µL de tampão HEPES suplementado. Após 10 min de pré-incubação, acrescentou-se 10 µL dos estímulos (PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique*, piratoxina-I, bothroptoxina-II, carbacol ou ceruleína em diferentes concentrações). Nos poços controle foi adicionado 10 µL do tampão HEPES. Após 1 h de incubação em estufa (37°C), foi acrescentado 10 µL de MTT (5 mg/mL em tampão HEPES). Foi feita outra incubação de 3 horas em estufa (37°C), após o qual adicionou-se 100 µL de SDS 10% em HCl 0,01 M, e incubado por mais 24 horas em estufa (37°C) para dissolução do MTT incorporado pelos ácidos. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância no comprimento de onda de 550 nm. Os resultados foram expressos como % em relação ao controle.

3.5. Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média para *n* experimentos. Os resultados foram analisados por análise da variância (ANOVA) seguido pelo teste modificado de Bonferroni. Valores de *P*<0,05 foram considerados significativos.

Os resultados referentes a estimulação de ácinos pancreáticos foram expressos como valores percentuais [mediana (valor máximo-valor mínimo)] e analisados por ANOVA seguido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS:

4.1. Efeito da injeção de piratoxina-I no ducto biliopancreático de ratos

4.1.1. Curvas dose e tempo-efeito

Inicialmente, foi avaliada a capacidade da piratoxina-I, em induzir alterações no pâncreas e pulmão de ratos quando administrada no ducto biliopancreático. Foram realizados experimentos com doses de 100 a 1000 $\mu\text{g/kg}$ no tempo de 4 h após a indução. Na dose de 100 $\mu\text{g/kg}$, a piratoxina-I foi capaz de aumentar significativamente o extravasamento de proteínas plasmáticas no pâncreas e os níveis de amilase sérica, quando comparado com o grupo salina, sem afetar a atividade de MPO no tecido pulmonar (Figura 3). Na dose de 300 $\mu\text{g/kg}$, a piratoxina-I induziu alterações semelhantes à dose anterior para o extravasamento de proteínas plasmáticas no pâncreas e níveis de amilase sérica e, adicionalmente, aumentou significativamente a atividade de MPO no pulmão. Utilizando-se a dose de 1000 $\mu\text{g/kg}$ não foram observados efeitos adicionais para o extravasamento de proteínas plasmáticas no pâncreas ou para a atividade de MPO pulmonar; apenas os níveis de amilase sérica foram aumentados significativamente (Figura 3). A partir desses resultados, a dose de 300 $\mu\text{g/kg}$ foi escolhida para ser utilizada nos protocolos experimentais subsequentes, pois é capaz de induzir alterações significativas em todos os parâmetros avaliados.

Em seguida, foi realizada a curva de tempo-efeito (4-96 h) para a pancreatite induzida pela piratoxina-I, na dose de 300 $\mu\text{g/kg}$ (Figura 4). Foi observado que a piratoxina-I aumentou significativamente o extravasamento de proteínas plasmáticas no pâncreas nos tempos de 4, 8 e 12 h, quando comparados com os respectivos grupos salina.

Nos tempos posteriores (24, 48 e 96 h) não foi verificado aumento desse extravasamento. A atividade de MPO no pulmão foi aumentada significativamente nos tempos de 4 e 8 h após a injeção da piratoxina-I, e os níveis de amilase sérica apenas no tempo de 4 h após a injeção (Figura 4).

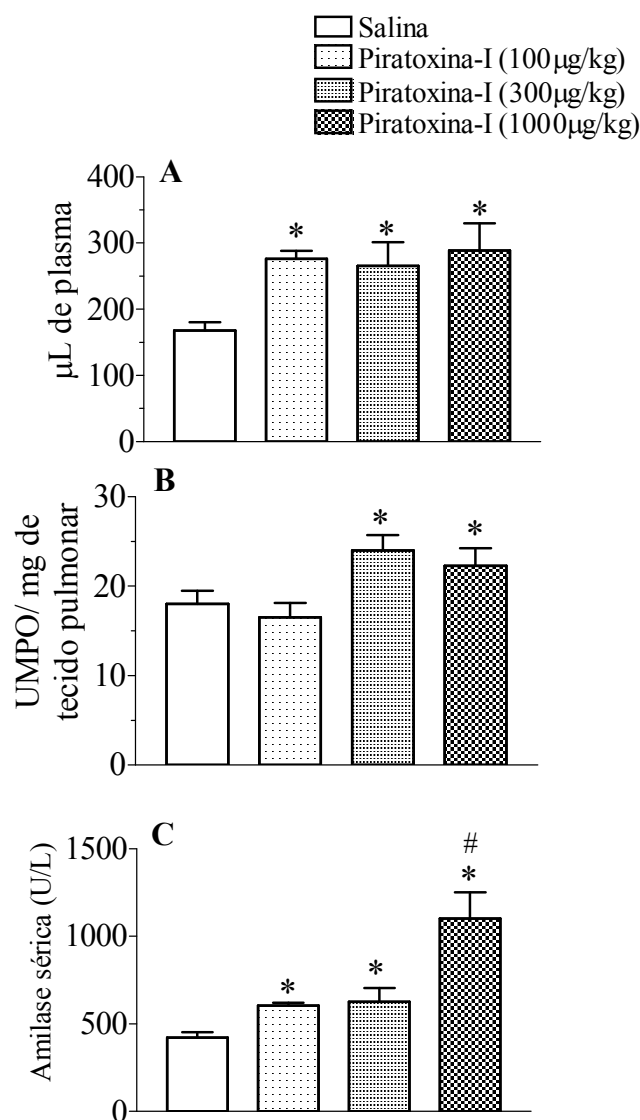


Figura 3: Curva dose resposta da pancreatite induzida pela injeção no ducto bilipancreático de piratoxina-I. O extravasamento de proteínas plasmáticas (A), a atividade de MPO no pulmão (B) e os níveis de amilase sérica (C) foram expressos, respectivamente, como µL de proteínas plasmáticas extravasadas, unidades de MPO/mg de tecido e U de amilase/L de soro. Cada ponto representa a média de 5-8 animais. * $P < 0,05$ comparando-se com o grupo salina e # $P < 0,05$ comparando-se com o grupo piratoxina-I (300 µg/kg).

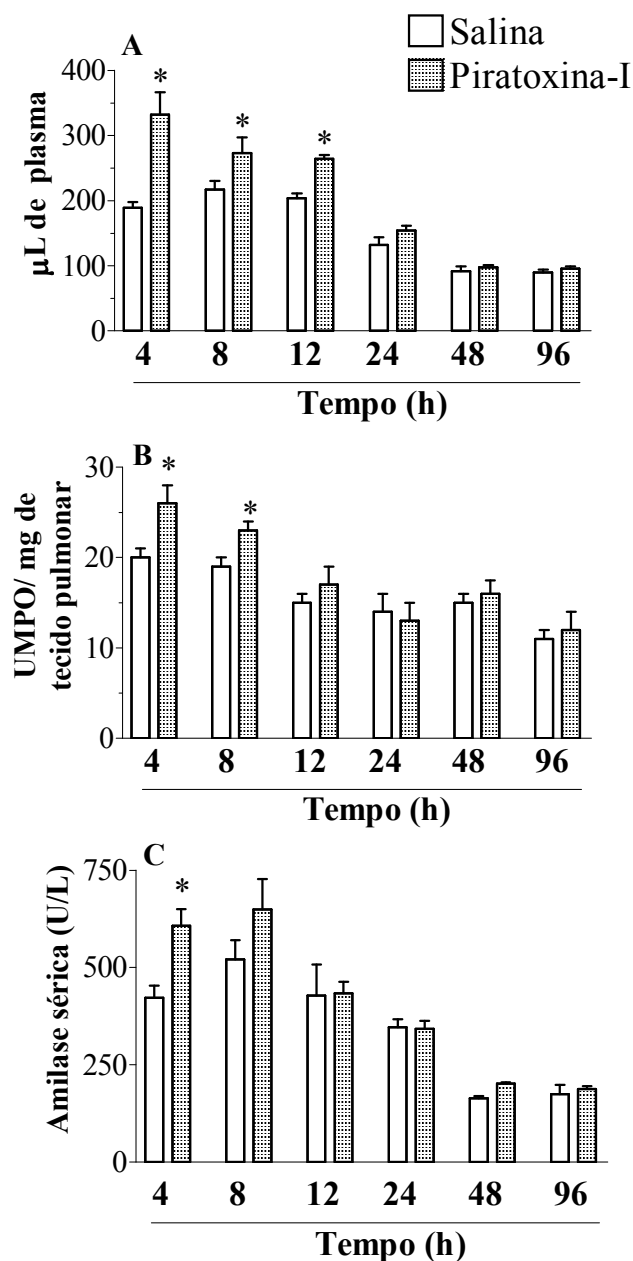


Figura 4: Curva tempo resposta da pancreatite induzida pela injeção no ducto bilipancreático de piratoxina-I (300 µg/kg). O extravasamento de proteínas plasmáticas (A), a atividade de MPO no pulmão (B) e os níveis de amilase sérica (C) foram expressos, respectivamente, como µL de proteínas plasmáticas extravasadas, unidades de MPO/mg de tecido e U de amilase/L de soro. Cada ponto representa a média de 5-8 animais. * $P < 0,05$ comparando-se com o respectivo grupo salina.

4.1.2. Alterações histológicas no pâncreas e pulmão de ratos submetidos à injeção da piratoxina-I no ducto biliopancreático

A análise estrutural do pâncreas e pulmão quanto às alterações produzidas pela administração intraductal de piratoxina-I (300 µg/kg) foi feita através de métodos histoquímicos, comparando-os com o do grupo salina. A administração de 0,3 mL de solução salina no ducto biliopancreático de ratos não promoveu alterações histopatológicas marcantes nos órgãos analisados.

No tecido pancreático dos animais submetidos à injeção intraductal de piratoxina-I foi observada a presença de infiltrado neutrofílico com áreas de necrose das células acinares e edema intersticial nos tempos de 4 e 8 h após a injeção. Estes fenômenos persistiram ainda nos tempos de 12 e 24 h após o tratamento. No período de 24 h, particularmente, foram observadas áreas com intensa destruição de células acinares e extensas regiões de fibrose no interstício. Após 48 h, foram detectadas áreas de fibrose, mas com uma diminuição no edema intersticial e infiltrado de neutrófilos. As áreas de necrose também pareceram diminuir após esse período. Ao término de 96 h após a injeção da piratoxina-I, o pâncreas apresentou significativa regressão das alterações patológicas, indicando regeneração do parênquima (Figura 5).

Nos pulmões desses mesmos animais foram observadas áreas de edema intersticial acompanhadas de diminuição do espaço alveolar, além de alguns focos hemorrágicos, a partir de 4 h, porém com maior intensidade 8 h após a injeção de piratoxina-I, persistindo até o último período avaliado (Figura 6).

Os resultados de curva dose e tempo-efeito, aliados à análise histológica, nos permitem afirmar que a piratoxina-I induz pancreatite aguda quando injetada no ducto biliopancreático de ratos, que é caracterizada por (i) extravasamento de proteínas plasmáticas no pâncreas, (ii) influxo de neutrófilos para o pulmão, (iii) níveis elevados de amilase no soro e (iv) alterações morfológicas nos tecidos pancreático e pulmonar. Além disso, esses eventos são mais evidentes nos tempos iniciais da pancreatite. Os protocolos experimentais subseqüentes foram conduzidos fixando-se o tempo de 4 h e a dose de 300 µg/kg para todas as PLA₂s.

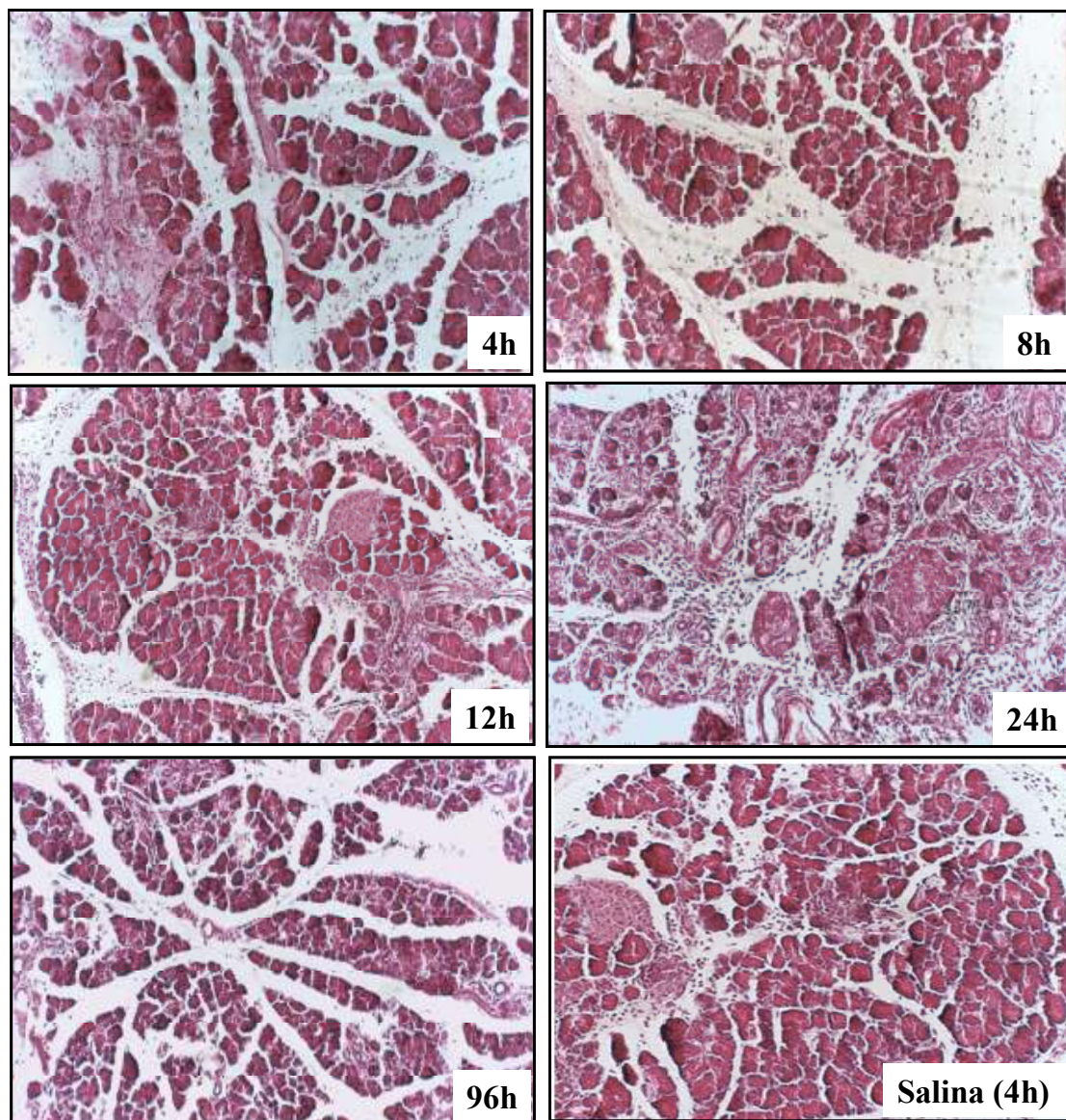


Figura 5: Tecido pancreático de ratos submetidos à injeção no ducto biliopancreático de piratoxina-I (300 $\mu\text{g/kg}$). O pâncreas dos animais foi retirado e processado para análise histológica nos tempos indicados. A partir do tempo de 4 h foi observada presença de edema intersticial e infiltrado de neutrófilos, que persistem nos tempos de 8 e 12 h. No tempo de 24 h foi observado adicionalmente presença de áreas com intensa destruição das células acinares. Ao término de 96 h após a injeção da piratoxina-I, o pâncreas apresentou significativa regressão das alterações patológicas, indicando regeneração do parênquima. Coloração com hematoxilina e eosina (n=3), aumento final: 160x.

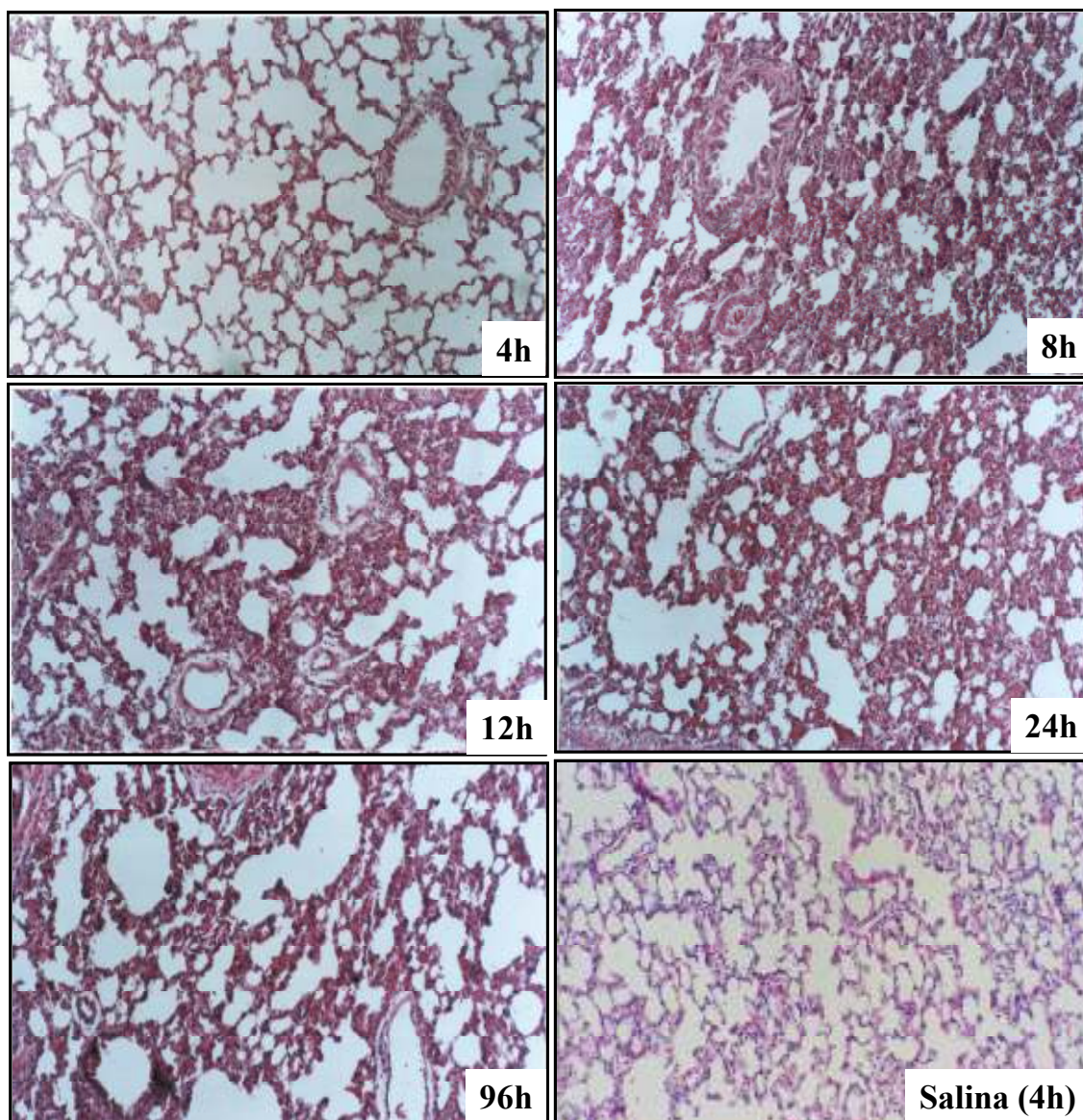


Figura 6: Tecido pulmonar de ratos submetidos à injeção no ducto biliopancreático de piratoxina-I (300 µg/kg). O pulmão dos animais foi retirado e processado para análise histológica nos tempos indicados. Foi observada presença de edema intersticial com concomitante diminuição do espaço alveolar a partir de 4 h, que é intensificada no tempo de 8 h e persiste até 96 h após a indução. Coloração com hematoxilina e eosina (n=3), aumento final: 160x.

4.2. Participação da atividade catalítica das PLA₂s secretórias na indução da pancreatite aguda e estimulação *in vitro* de ácinos pancreáticos

Nessa etapa do trabalho foram utilizadas PLA₂s secretórias com diferentes atividades catalíticas. Dessa forma foram utilizadas: (i) piratoxina-I (desprovida de atividade catalítica), (ii) bothropstoxina-II (com atividade catalítica moderada) e (iii) PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique* (com alta atividade catalítica), todas na dose de 300 µg/kg. Essas PLA₂s também foram utilizadas para estimular ácinos pancreáticos isolados *in vitro* e verificar a possível correlação entre liberação de amilase e a atividade catalítica. Nesse protocolo também foi realizada a medida da viabilidade dos ácinos pancreáticos pela técnica de incorporação do MTT, para certificar que as PLA₂s não causavam morte dos ácinos pancreáticos.

4.2.1. Influência da atividade catalítica das PLA₂ secretórias sobre os efeitos inflamatórios locais da pancreatite

Após 4 h da administração de piratoxina-I, bothropstoxina-II ou PLA₂ *Naja mocambique mocambique* no ducto biliopancreático de ratos, foi observado aumento significativo no extravasamento de proteínas plasmáticas no pâncreas (75, 66 e 65% respectivamente), em relação ao grupo salina (Figura 7A). Esse aumento foi acompanhado por um influxo significativo de neutrófilos no pâncreas, medido através da atividade da MPO (181, 221 e 231% respectivamente; Figura 7B). Nessa etapa do trabalho utilizamos um grupo de animais injetados com tauricolato de sódio (controle positivo da pancreatite), nos quais também foram observados aumentos significativos para o extravasamento de proteínas plasmáticas (46%; Figura 7A) e influxo neutrofílico pancreático (147%; Figura 7B).

4.2.2. Influência da atividade catalítica das PLA₂ secretórias sobre o influxo de neutrófilos no pulmão

A injeção de piratoxina-I no ducto biliopancreático aumentou em 26% ($P<0,05$) a atividade de MPO no pulmão dos animais em comparação com o grupo salina. A administração de bothropstoxina-II ou de PLA₂ *Naja mocambique mocambique* também aumentou a atividade de MPO em 59 e 73% ($P<0,05$) respectivamente em comparação com o grupo salina ou em 26 e 38% ($P<0,05$) respectivamente em comparação com o grupo piratoxina-I (Figura 7C). A atividade de MPO pulmonar também foi aumentada significativamente pela injeção de tauracolato de sódio quando comparado ao grupo salina (130%).

4.2.3. Influência da atividade catalítica das PLA₂ secretórias sobre os níveis séricos de amilase

A injeção no ducto biliopancreático de tauracolato de sódio aumentou em 214% ($P<0,05$) os níveis de amilase sérica quando comparado ao grupo salina. A administração de piratoxina-I e bothropstoxina-II elevaram os níveis dessa enzima em 44 e 63% ($P<0,05$) respectivamente em relação ao grupo salina. Em relação à administração de PLA₂ *Naja mocambique mocambique* o aumento da amilase sérica foi de 93% ($P<0,05$) quando comparado ao grupo salina (Figura 7D).

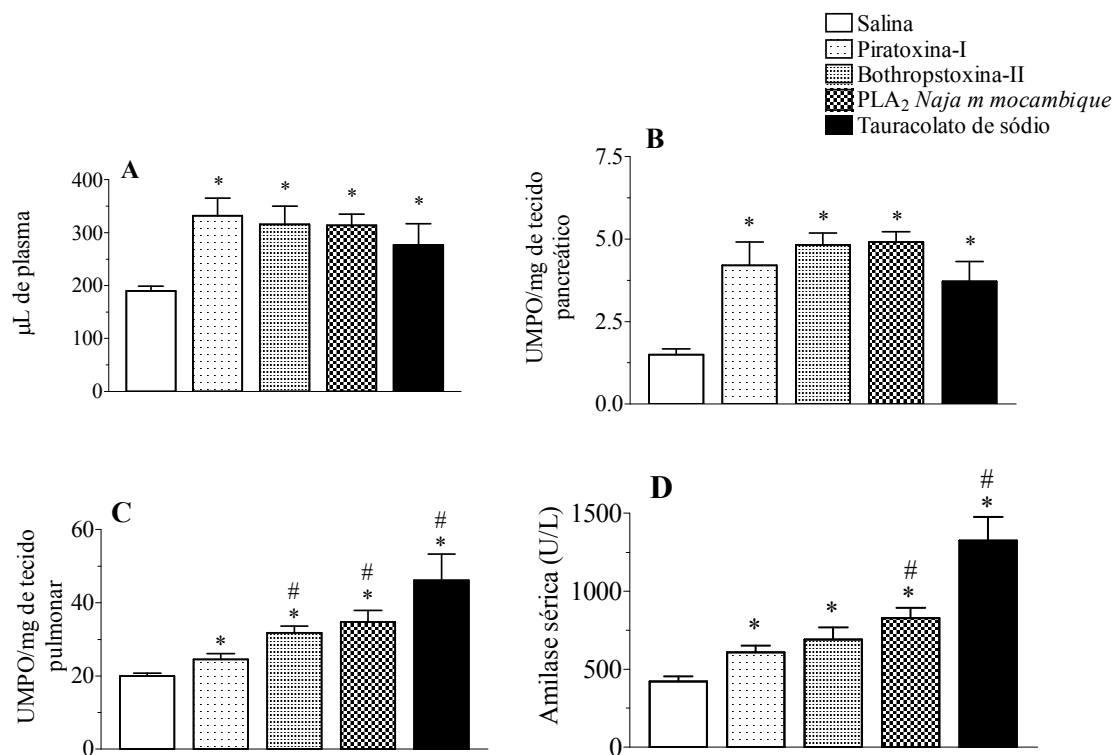


Figura 7: Efeito da injeção no ducto biliopancreático de piratoxina-I, bothropstoxina-II ou PLA₂ *Naja mocambique mocambique*. Salina, piratoxina-I, bothropstoxina-II, PLA₂ *Naja mocambique mocambique* (300 $\mu\text{g/kg}$ para todas as PLA₂) ou tauracolato de sódio (5%) foram injetados no ducto biliopancreático de ratos. O extravasamento de proteínas plasmáticas (A), a atividade de MPO no pâncreas (B) e pulmão (C) e os níveis de amilase sérica (D) foram expressos, respectivamente, como μL de proteínas plasmáticas extravasadas, unidades de MPO/mg de tecido pancreático ou pulmonar e U de amilase/L de soro. Cada barra representa a média de 5-8 ratos. * $P < 0,05$ comparando-se com os animais do grupo salina e # $P < 0,05$ comparando-se com os animais do grupo piratoxina-I.

4.2.4. Influência da atividade catalítica das PLA₂ secretórias sobre a secreção de amilase de ácidos pancreáticos isolados

Primeiramente, foi necessário validar o protocolo utilizado de isolamento e estimulação dos ácidos pancreáticos. Para tanto, foram utilizadas curvas dose efeito para dois compostos amplamente utilizados para induzir a liberação de amilase de ácidos pancreáticos, o carbacol (agonista de receptores colinérgicos) e a ceruleína (análogo de colecistocinina). A estimulação com carbacol (10 e 100 µM) e ceruleína (10 e 100 nM) promoveu liberação significativa de amilase dos ácidos pancreáticos, quando comparados ao grupo controle (Tabela 2). Os percentuais de liberação encontrados para esses compostos foram semelhantes aos descritos por vários outros autores (Peikin e cols., 1978; Chaudhuri e cols., 2005; Gautam e cols., 2005).

Em seguida, foi avaliada a habilidade das PLA₂s *in vitro* de induzir liberação de amilase. A piratoxina-I induziu liberação de amilase de maneira significativa nas concentrações entre 1 e 10 µg/mL quando comparados ao grupo controle. Foi também observado que a estimulação com piratoxina-I não alterou de maneira significativa a viabilidade dos ácidos pancreáticos em nenhuma das concentrações estudadas (Tabela 2).

A bothropstoxina-II, nas concentrações de 0,3 a 10 µg/mL, induziu liberação significativa de amilase dos ácidos pancreáticos. A viabilidade acinar não foi modificada pela bothropstoxina-II nas concentrações de 0,1 a 3 µg/mL, porém, na concentração de 10 µg/mL, houve diminuição significativa da viabilidade (Tabela 2).

A PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique* também induziu liberação significativa e concentração-dependente de amilase a partir de 0,03 µg/mL, persistindo esse efeito de maneira dose-dependente até a maior concentração testada (10 µg/mL). A estimulação com PLA₂ *Naja mocambique mocambique*, nas concentrações entre 0,01 e 1 µg/mL, não afetou significativamente a viabilidade dos ácidos pancreáticos; contudo, em concentrações maiores, houve diminuição significativa da viabilidade dos ácidos (Tabela 2).

Tabela 2: Liberação de amilase de ácidos pancreáticos e viabilidade celular após estimulação com as PLA₂s.

Tratamento	Concentração	% de amilase liberada	Viabilidade acinar (%)
Controle	--	4,6 (2,3-6,7)	102 (80-142)
Piratoxina-I	0,3 µg/mL	6,7 (5,1-7,5)	99 (62-124)
	1 µg/mL	6,7 (5,2-13,2)*	103 (71-129)
	3 µg/mL	7,4 (5,5-10,1)*	98 (81-108)
	10 µg/mL	6,7 (5,2-10,6)*	103 (83-120)
Bothropstoxina-II	0,1 µg/mL	6,4 (6,4-6,5)	106 (66-130)
	0,3 µg/mL	8,5 (6,7-13,1)*	105 (67-142)
	1 µg/mL	9,9 (8,9-12,9)*	113 (91-136)
	3 µg/mL	13,0 (6,4-14,2)*	90 (50-139)
	10 µg/mL	25,0 (6,7-39,1)*	78 (36-88)*
PLA ₂ <i>Naja m mocambique</i>	0,01 µg/mL	7,5 (6,2-7,8)	103 (89-114)
	0,03 µg/mL	8,2 (7,6-8,6)*	115 (83-131)
	0,1 µg/mL	13,3 (7,8-17,3)*	118 (93-135)
	0,3 µg/mL	11,9 (9,1-19,9)*	106 (64-136)
	1 µg/mL	14,1 (9,0-27,6)*	92 (50-106)
	3 µg/mL	23,3 (13,9-35,7)*	59 (48-103)*
	10 µg/mL	29,0 (22,6-31,5)*	64 (60-38)*
Carbacol	1 µM	4,3 (4,2-4,8)	ND
	10 µM	6,8 (6,2-7,9)*	ND
	100 µM	9,2 (5,7-20,9)*	96 (73-115)
Ceruleína	1 nM	4,5 (3,5-6,7)	ND
	10 nM	7,2 (5,1-8,3)*	ND
	100 nM	9,0 (6,6-11,5)*	ND

A produção de amilase e a viabilidade foram analisadas após 1 h de incubação. Os valores percentuais são mostrados como mediana (valor máximo – valor mínimo) para 3-4 experimentos realizados em duplicata. ND (não determinado). * $P < 0.05$ comparado com o grupo controle.

4.3. Mediadores envolvidos na pancreatite induzida pelas PLA₂ secretórias

Após a caracterização da pancreatite aguda induzida pelas PLA₂s secretórias foram realizados tratamentos com antagonistas ou inibidores de mediadores do processo inflamatório. Para isso, foram realizados tratamentos com (i) inibidor da síntese de TNF- α (pentoxifilina), (ii) inibidor dos receptores NK₁ (SR140333), (iii) inibidor dos receptores B₂ de bradicinina (icatibant), (iv) inibidores das COXs não seletivo (indometacina) ou seletivo COX-2 (celecoxib), (v) inibidor da 5-lipoxigenase (AA861), (vi) inibidores de receptores de PAF (PCA4248) e, finalmente, (vii) inibidores das isoformas das NOS não seletivo (L-NAME) ou preferencial para iNOS (aminoguanidina). Nessa etapa, foi utilizada a PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique*, por se tratar da PLA₂ que causa maior efeito secundário pulmonar. Os resultados encontram-se sumarizados na tabela 3.

4.3.1. Efeito dos diversos tratamentos sobre os eventos inflamatórios locais

O extravasamento de proteínas plasmáticas no pâncreas induzido pela injeção de PLA₂ *Naja mocambique mocambique* no ducto biliopancreático foi diminuído significativamente pelos tratamentos com pentoxifilina, SR140333 e icatibant. O SR140333 e o icatibant diminuíram significativamente o influxo de neutrófilos para o pâncreas, o que não foi observado com a pentoxifilina (Figura 8).

Em relação ao L-NAME foi observada uma inibição do extravasamento de proteínas plasmáticas, e uma exacerbação do influxo de neutrófilos para o tecido pancreático (Figura 9). Esses efeitos não foram observados com o tratamento com aminoguanidina (Figura 9).

A inibição não seletiva da COX com indometacina não alterou o extravasamento de proteínas plasmáticas no pâncreas; contudo, o extravasamento foi diminuído significativamente com o tratamento com celecoxib (Figura 10A). Nenhum desses tratamentos afetou significativamente a atividade de MPO no pâncreas (Figura 9). Os tratamentos com PCA4248 ou AA861 não afetaram o extravasamento de proteínas plasmáticas ou o influxo de neutrófilos para o tecido pancreático (Figura 10).

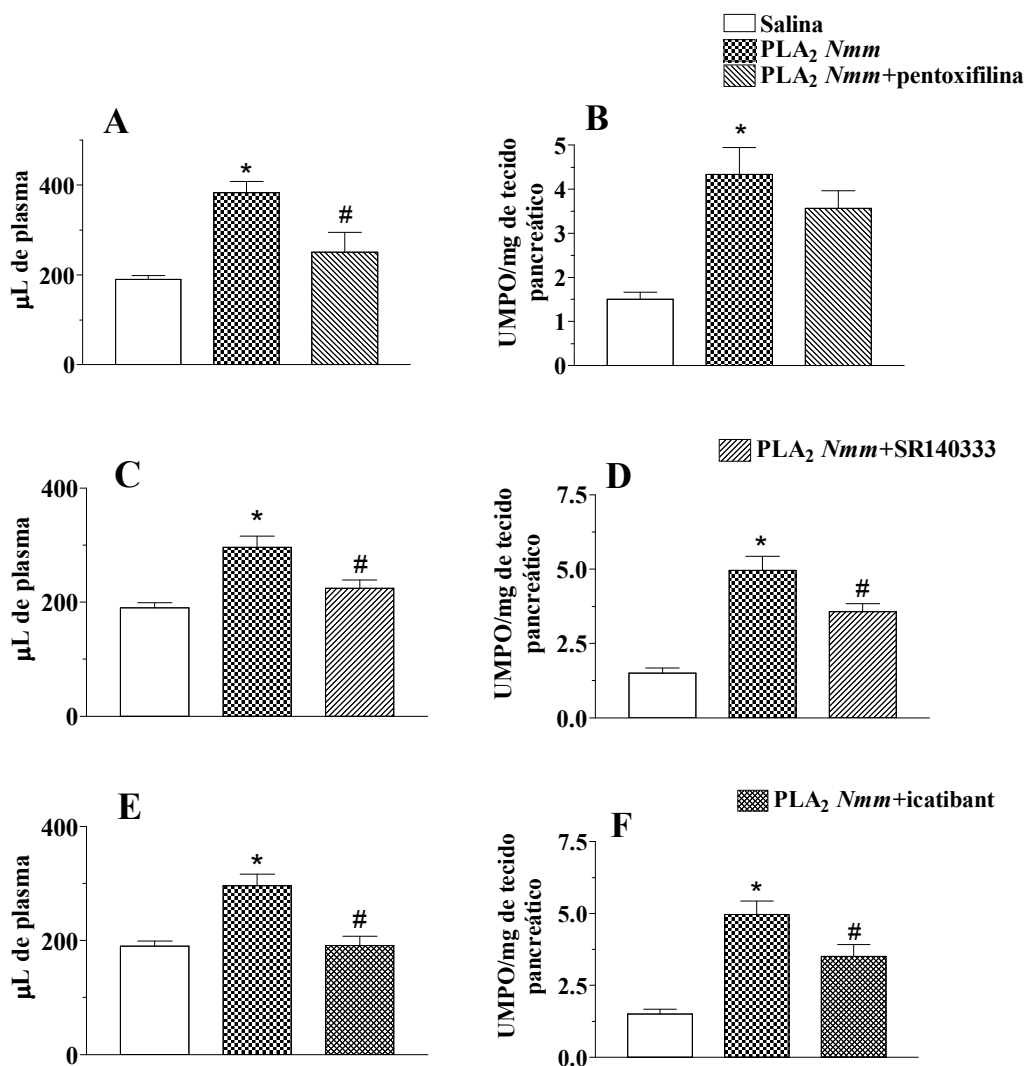


Figura 8: Efeito da pentoxifilina, SR140333 e icatibant sobre os eventos inflamatórios locais da pancreatite aguda induzida pela PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique* (Nmm). PLA₂ Nmm (300 μg/kg) foi administrada no ducto biliopancreático de ratos controle ou tratados com pentoxifilina (100 mg/kg, painéis A e B), SR140333 (120 nmol/kg, painéis C e D) ou icatibant (100 nmol/kg, painéis E e F). Foram avaliados os efeitos desses tratamentos sobre o extravasamento de proteínas plasmáticas no pâncreas (painéis A, C e E) e a atividade de MPO no pâncreas (painéis B, D e F). Todos os parâmetros foram avaliados após 4 h da indução. Cada barra representa a média de 5-8 ratos. * $P < 0.05$ comparando-se com o grupo salina e # $P < 0.05$ comparando-se com os animais do grupo PLA₂ Nmm.

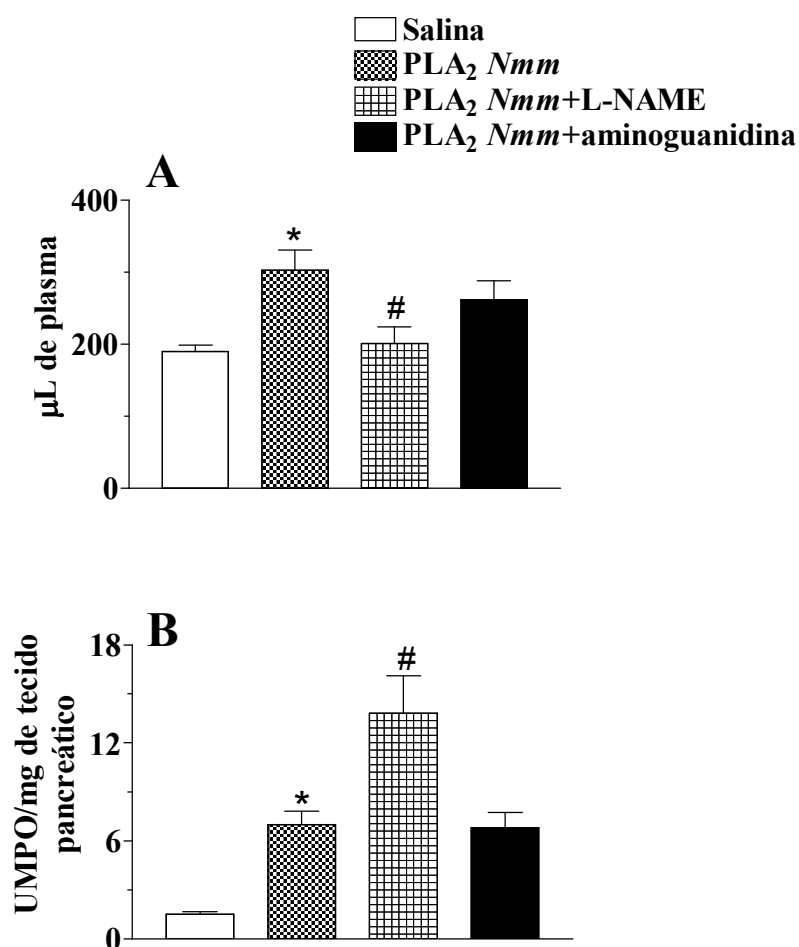


Figura 9: Efeito do L-NAME e da aminoguanidina sobre os eventos inflamatórios locais da pancreatite aguda induzida pela PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique*. PLA₂ *Nmm* (300 µg/kg) foi administrada no ducto biliopancreático de ratos controle ou tratados com L-NAME ou aminoguanidina. Foram avaliados os efeitos desses tratamentos sobre o extravasamento de proteínas plasmáticas no pâncreas (painel A) e a atividade de MPO no pâncreas (painel B). Todos os parâmetros foram avaliados após 4 h da indução. Cada barra representa a média de 5-8 ratos. * $P < 0.05$ comparando-se com o grupo salina e # $P < 0.05$ comparando-se com os animais do grupo PLA₂ *Nmm*.

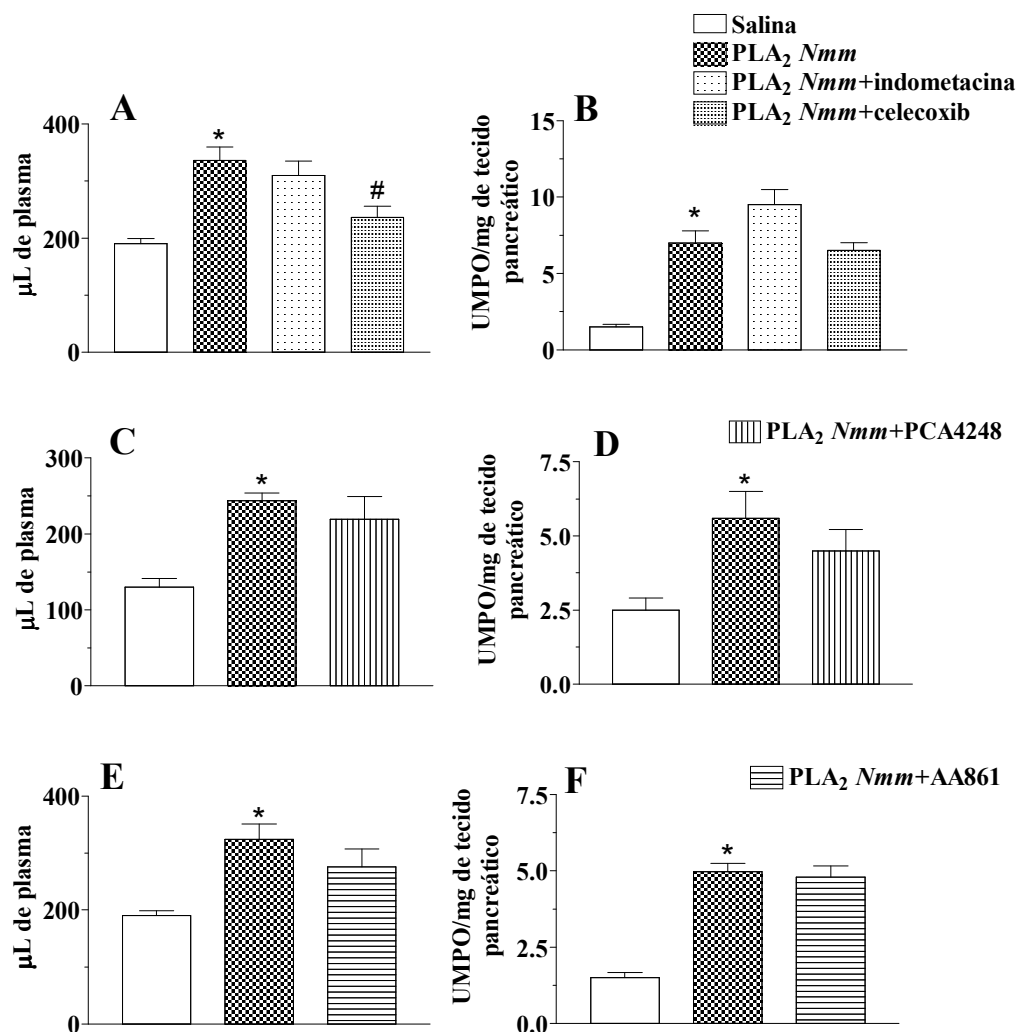


Figura 10: Efeito da inibição da indometacina, celecoxib, PCA4248 e AA861 sobre os eventos inflamatórios locais da pancreatite aguda induzida pela PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique*. PLA₂ Nmm (300 μg/kg) foi administrada no ducto biliopancreático de ratos controle ou tratados com indometacina ou celecoxib (5 e 20 mg/kg respectivamente, painéis A e B), PCA4248 (5 mg/kg, painéis C e D) ou AA861 (0,2 mg/kg, painéis E e F). Foram avaliados os efeitos desses tratamentos sobre o extravasamento de proteínas plasmáticas no pâncreas (painéis A, C e E) e a atividade de MPO no pâncreas (painéis B, D e F). Todos os parâmetros foram avaliados após 4 h da indução. Cada barra representa a média de 5-8 ratos. *P<0.05 comparando-se com o grupo salina e #P<0,05 comparando-se com os animais do grupo PLA₂ Nmm.

4.3.2. Efeito dos diversos tratamentos sobre o influxo neutrofílico pulmonar

O influxo de neutrófilos para o pulmão induzido pela injeção de PLA₂ *Naja mocambique mocambique* no ducto biliopancreático, medido através da atividade da MPO, foi significativamente diminuído pelos tratamentos com pentoxifilina e icatibant, mas não pelo SR140333 (Figura 11A-C).

Além disso, a inibição não seletiva das NOS pelo L-NAME, bem como a inibição preferencial da iNOS pela aminoguanidina não afetaram significativamente o influxo de neutrófilos para o pulmão (Figura 11D).

Já o tratamento com indometacina inibiu significativamente o influxo neutrofílico pulmonar, ao passo que o celecoxib não teve efeito. O antagonista de receptores de PAF, PCA4248, também causou diminuição significativa do influxo neutrofílico pulmonar, o que não foi observado com a inibição da 5-lipoxigenase pelo tratamento com o composto AA861 (Figura 12).

4.3.3. Efeito dos diversos tratamentos sobre os níveis séricos de amilase

Os níveis séricos de amilase foram diminuídos significativamente apenas pelo tratamento com icatibant. Os animais tratados com L-NAME mostraram uma tendência de elevação nos níveis de amilase. (Figuras 13 e14).

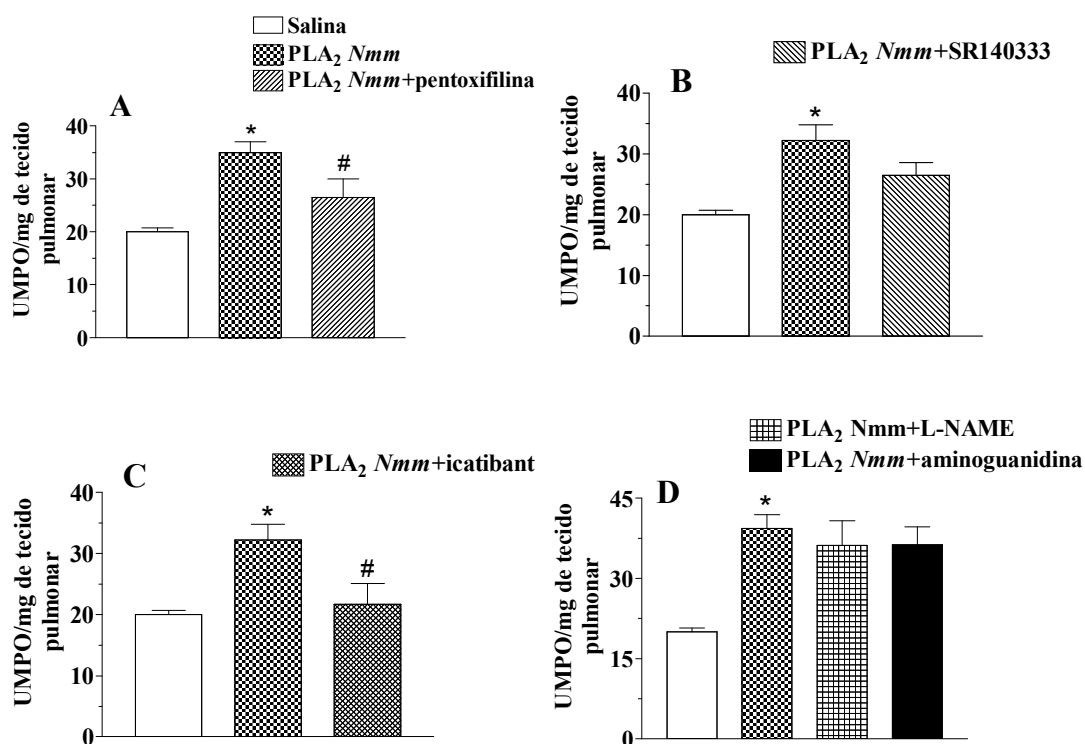


Figura 11: Efeito da pentoxifilina, SR140333, icatibant, L-NAME e aminoguanidina sobre o influxo de neutrófilos para o tecido pulmonar secundário a pancreatite aguda induzida pela PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique*. PLA₂ Nmm (300 µg/kg) foi administrada no ducto biliopancreático de ratos controle ou tratados com pentoxifilina (100 mg/kg, painel A), SR140333 (120 nmol/kg, painel B), icatibant (100 nmol/kg, painel C), L-NAME (20 mg/kg, Painel D) e aminoguanidina (50 mg/kg, painel D). Foram avaliados os efeitos desses tratamentos sobre a atividade de MPO no pulmão. Todos os parâmetros foram avaliados após 4 h da indução. Cada barra representa a média de 5-8 ratos. * $P < 0.05$ comparando-se com o grupo salina e # $P < 0,05$ comparando-se com os animais do grupo PLA₂ Nmm.

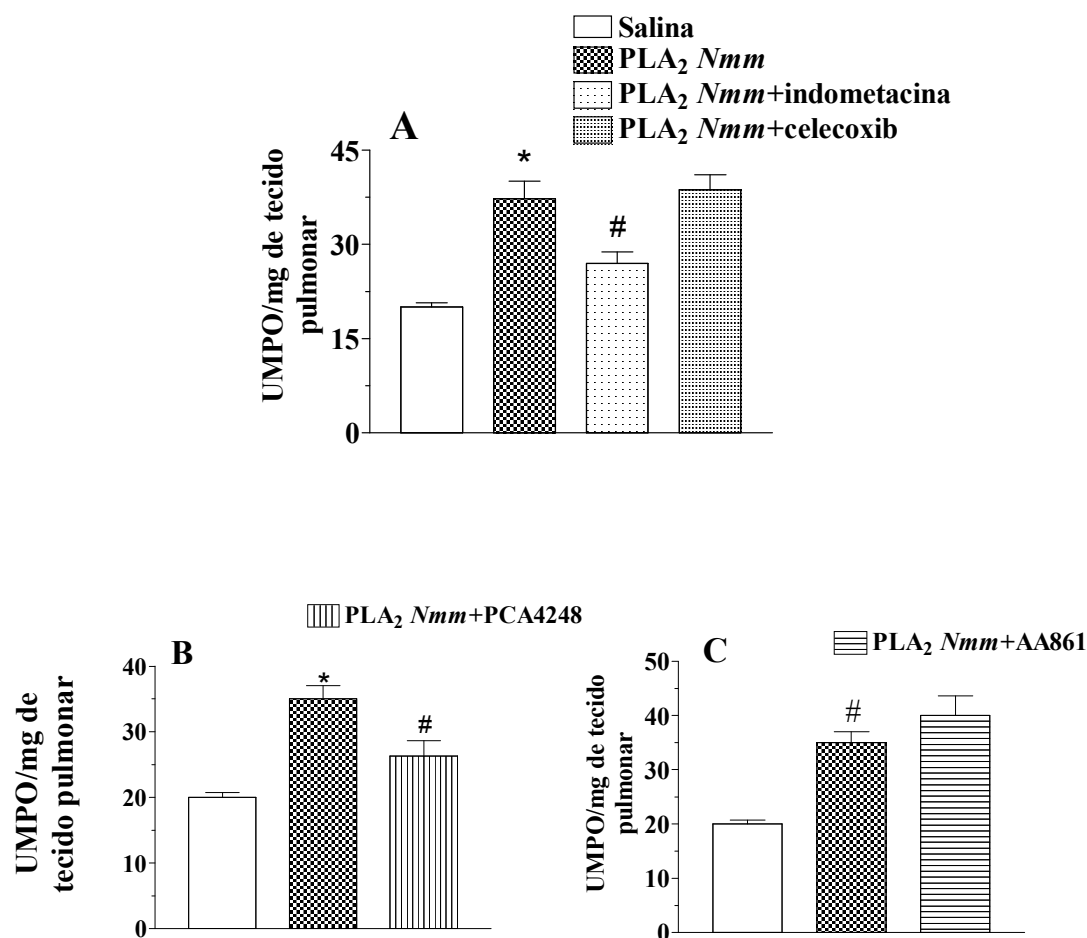


Figura 12: Efeito da indometacina, celecoxib, PCA4248 e AA861 sobre o influxo de neutrófilos para o tecido pulmonar secundário a pancreatite aguda induzida pela PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique*. PLA₂ Nmm (300 µg/kg) foi administrada no ducto biliopancreático de ratos controle ou tratados com indometacina ou celecoxib (5 e 20 mg/kg respectivamente, painel A), PCA4248 (5 mg/kg, painel B) ou AA861 (0,2 mg/kg, painel C). Foram avaliados os efeitos desses tratamentos sobre a atividade de MPO no pulmão. Todos os parâmetros foram avaliados após 4 h da indução. Cada barra representa a média de 5-8 ratos. * $P < 0.05$ comparando-se com o grupo salina e # $P < 0.05$ comparando-se com os animais do grupo PLA₂ Nmm.

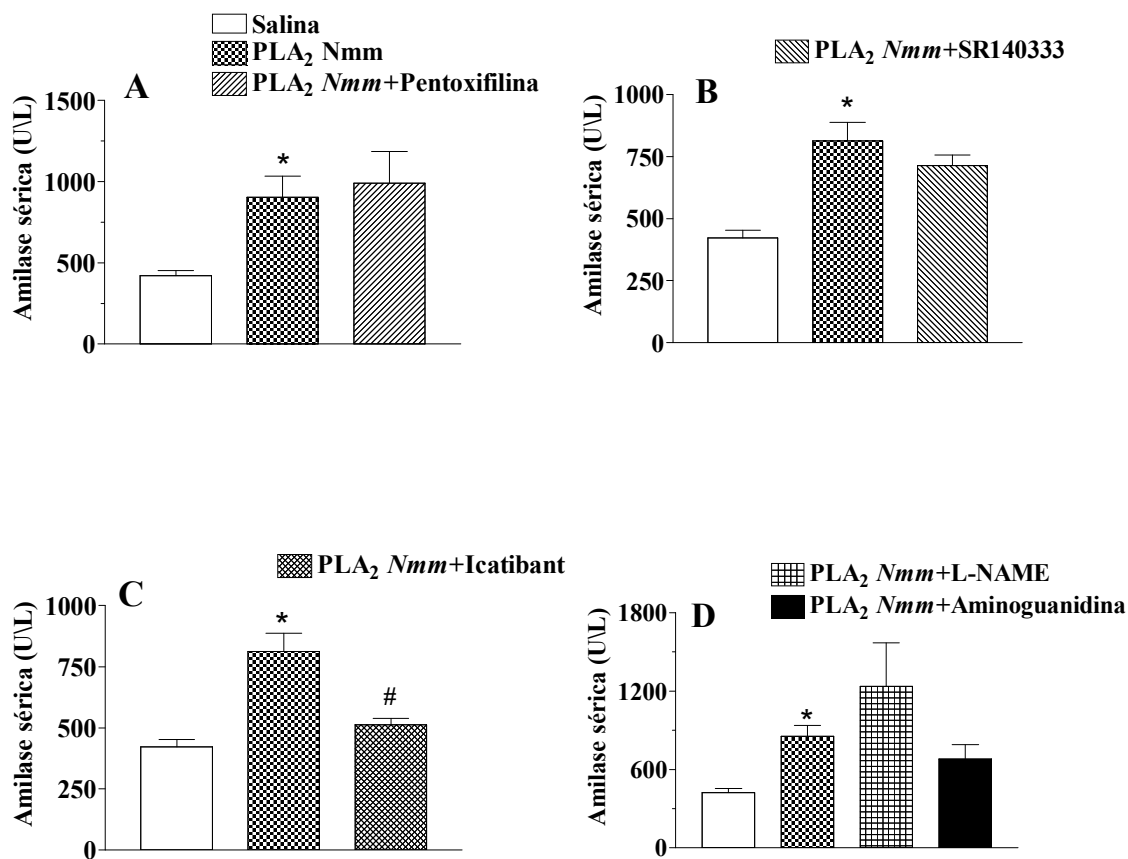


Figura 13: Efeito da pentoxifilina, SR140333, icatibant, L-NAME e aminoguanidina sobre os níveis séricos de amilase durante a pancreatite aguda induzida pela PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique*. PLA₂ Nmm (300 µg/kg) foi administrada no ducto biliopancreático de ratos controle ou tratados com pentoxifilina (100 mg/kg, painel A), SR140333 (120 nmol/kg, painel B), icatibant (100 nmol/kg, painel C), L-NAME (20 mg/kg, Painel D) e aminoguanidina (50 mg/kg, painel D). Foram avaliados os efeitos desses tratamentos sobre os níveis séricos de amilase. Todos os parâmetros foram avaliados após 4 h da indução. Cada barra representa a média de 5-8 ratos. * $P < 0.05$ comparando-se com o grupo salina e # $P < 0,05$ comparando-se com os animais do grupo PLA₂ Nmm.

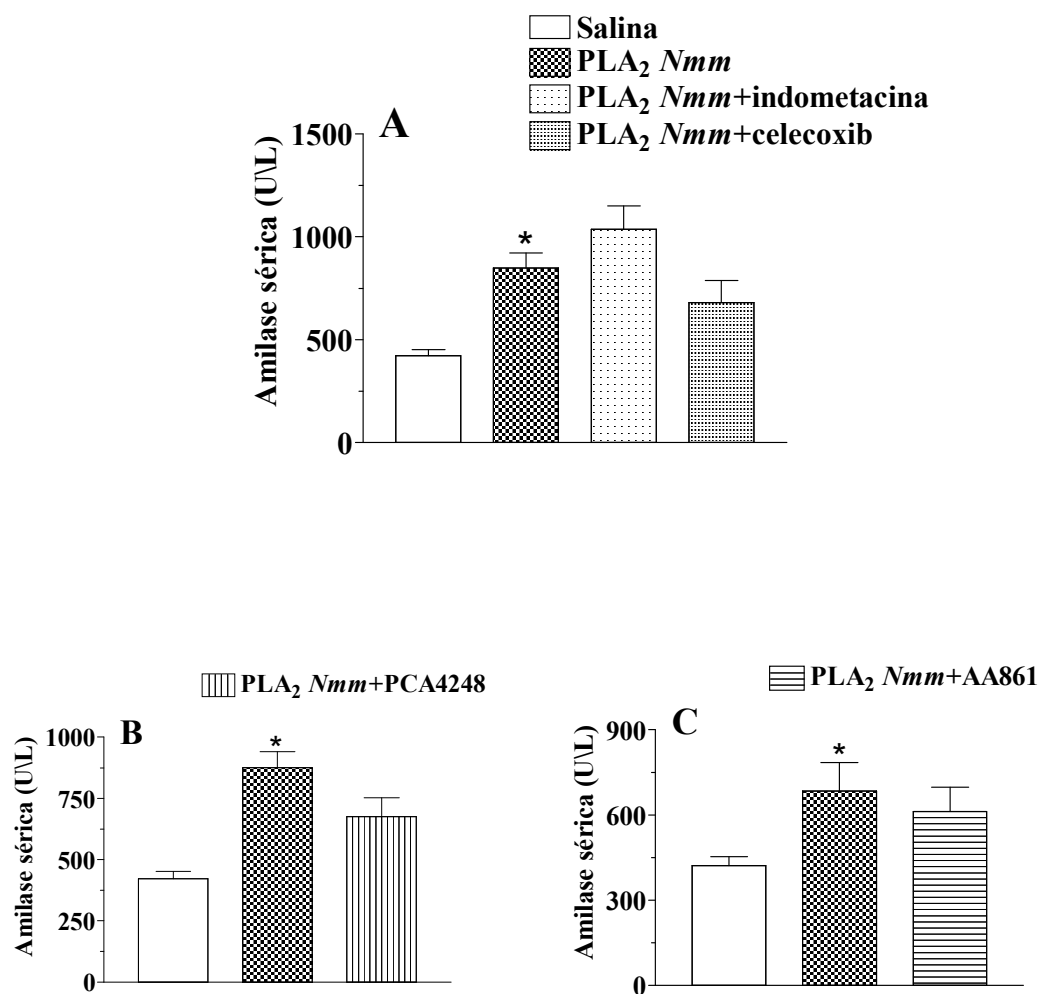


Figura 14: Efeito da inibição da indometacina, celecoxib, PCA4248 e AA861 sobre os níveis séricos de amilase durante a pancreatite aguda induzida pela PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique*. PLA₂ Nmm (300 µg/kg) foi administrada no ducto biliopancreático de ratos controle ou tratados com indometacina ou celecoxib (5 e 20 mg/kg respectivamente, painel A), PCA4248 (5 mg/kg, painel B) ou AA861 (0,2 mg/kg, painel C). Foram avaliados os efeitos desses tratamentos sobre os níveis séricos de amilase. Todos os parâmetros foram avaliados após 4 h da indução. Cada barra representa a média de 5-8 ratos. * $P < 0.05$ comparando-se com o grupo salina e # $P < 0,05$ comparando-se com os animais do grupo PLA₂ Nmm.

4.3.4. Efeito dos diversos tratamentos sobre os níveis de TNF- α no soro

A injeção de PLA₂ *Naja mocambique mocambique* no ducto biliopancreático induziu aumento significativo dos níveis de TNF- α no soro quando comparado com o grupo salina. Esse aumento foi totalmente prevenido pela pentoxifilina. Além disso, o SR140330 e o icatibant também diminuíram significativamente os níveis de TNF- α no soro (Figura 15A-C).

O tratamento com L-NAME reduziu de maneira significativa os níveis de TNF- α no soro, mas o tratamento com aminoguanidina não teve efeito significativo sobre esse parâmetro, apesar de haver uma tendência a menores valores de TNF- α para este tratamento (Figura 15D).

A indometacina e o PCA4248 também diminuíram significativamente os níveis de TNF- α no soro, ao passo que o celecoxib e o AA861 não tiveram efeito significativo (Figura 16).

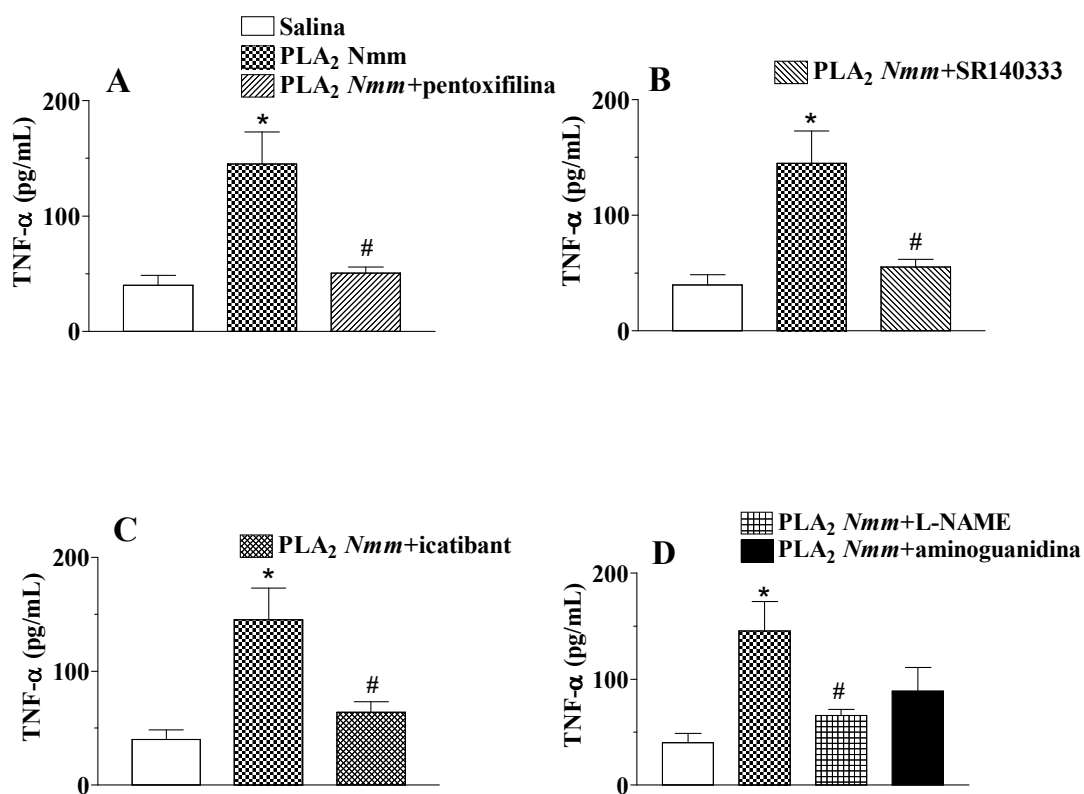


Figura 15: Efeito da pentoxifilina, SR140333, icatibant, L-NAME e aminoguanidina sobre os níveis séricos de TNF- α durante a pancreatite aguda induzida pela PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique*. PLA₂ Nmm (300 μ g/kg) foi administrada no ducto biliopancreático de ratos controle ou tratados com pentoxifilina (100 mg/kg, painel A), SR140333 (120 nmol/kg, painel B), icatibant (100 nmol/kg, painel C), L-NAME (20 mg/kg, Painel D) e aminoguanidina (50 mg/kg, painel D). Foram avaliados os efeitos desses tratamentos sobre os níveis séricos de TNF- α . Todos os parâmetros foram avaliados após 4 h da indução. Cada barra representa a média de 5-8 ratos. * $P < 0.05$ comparando-se com o grupo salina e # $P < 0,05$ comparando-se com os animais do grupo PLA₂ Nmm.

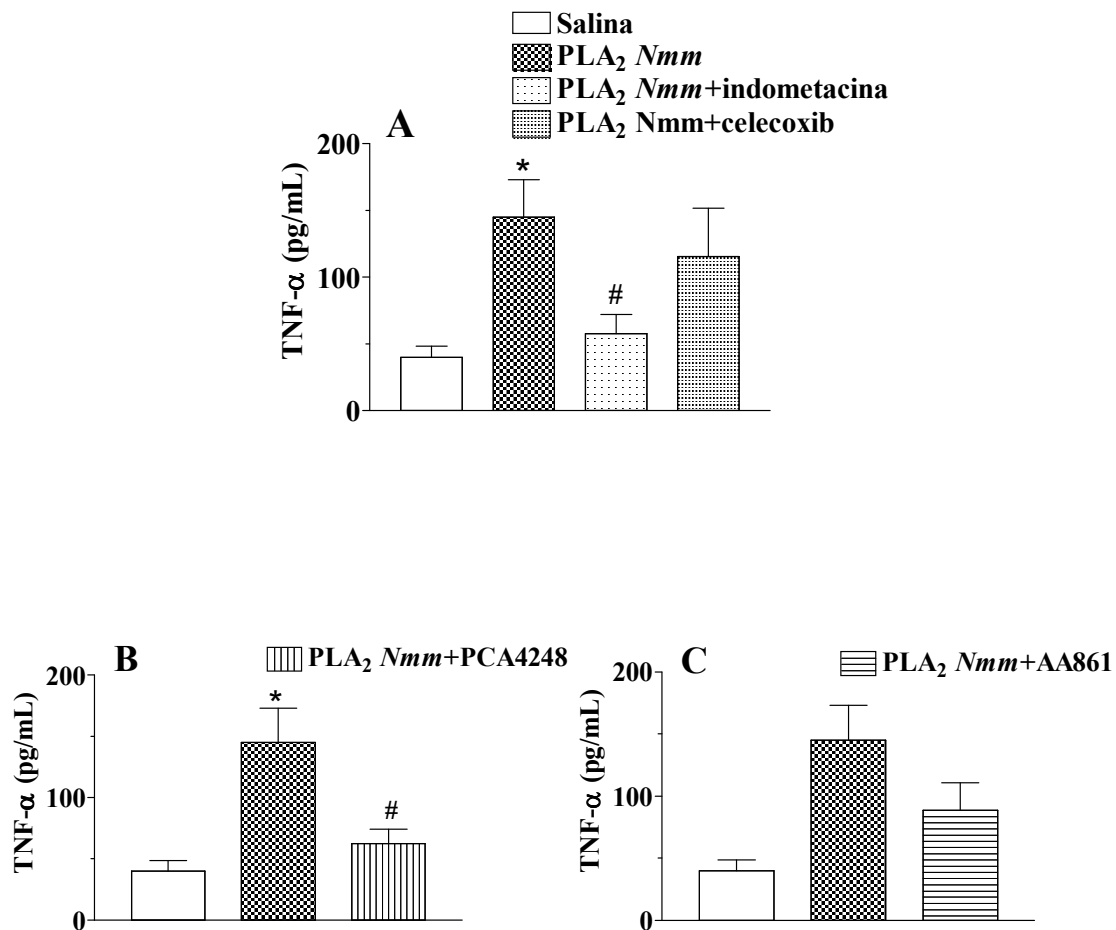


Figura 16: Efeito da indometacina, celecoxib, PCA4248 e AA861 sobre os níveis séricos de TNF- α durante a pancreatite aguda induzida pela PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique*. PLA₂ Nmm (300 μ g/kg) foi administrada no ducto biliopancreático de ratos controle ou tratados com indometacina ou celecoxib (5 e 20 mg/kg respectivamente, painel A), PCA4248 (5 mg/kg, painel B) ou AA861 (0,2 mg/kg, painel C). Foram avaliados os efeitos desses tratamentos sobre os níveis séricos de TNF- α . Todos os parâmetros foram avaliados após 4 h da indução. Cada barra representa a média de 5-8 ratos. * $P < 0.05$ comparando-se com o grupo salina e # $P < 0,05$ comparando-se com os animais do grupo PLA₂ Nmm.

4.3.5. Sumário dos resultados com os tratamentos

A tabela abaixo mostra um resumo dos dados obtidos com os tratamentos utilizados na pancreatite induzida pela PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique*.

Tabela 3: Resumo sobre os efeitos dos antagonistas/inibidores utilizados na pancreatite induzida por PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique*.

Tratamento	Extravasamento de proteínas plasmáticas	MPO pancreática	MPO pulmonar	Amilase sérica	TNF- α sérico
Pentoxifilina	↓	A	↓	A	↓
SR140333	↓	↓	A	A	↓
icatibant	↓	↓	↓	↓	↓
L-NAME	↓	↑	A	A	↓
Aminoguanidina	A	A	A	A	A
Indometacina	A	A	↓	A	↓
Celecoxib	↓	A	A	A	A
PCA4248	A	A	↓	A	↓
AA861	A	A	A	A	A

A presença ou ausência de efeito dos diversos tratamentos está indicada conforme segue: (↓), diminuição significativa; (↑), aumento significativo; (A) e ausência de efeito.

5. DISCUSSÃO:

As PLA₂s são enzimas que catalisam a hidrólise de fosfolípidos de membranas celulares gerando o ácido araquidônico que é o precursor comum para a formação de prostaglandinas, prostaciclina, tromboxano A₂, leucotrienos e PAF, importantes mediadores inflamatórios, fazendo dessas enzimas um relevante alvo terapêutico no tratamento de doenças inflamatórias.

Os eventos iniciais que desencadeiam a pancreatite aguda estão relacionados com a ativação indevida e prematura de enzimas pancreáticas enquanto ainda se encontram no pâncreas, passando a lesar o tecido. Dentre essas enzimas, encontram-se as PLA₂s, que colaboram para a lesão tecidual juntamente com outras enzimas, exercendo assim importante papel no desenvolvimento da pancreatite aguda. Adicionalmente, níveis elevados de PLA₂s circulantes foram encontrados no soro de pacientes com pancreatite aguda, relacionando-se diretamente com a severidade da doença (Büchler e col., 1989; Formela e col., 1995). Dessa forma, decidimos investigar a capacidade dessas enzimas de induzir pancreatite aguda. Embora vários modelos experimentais tenham sido desenvolvidos para o estudo da pancreatite induzida em animais de laboratório nenhum deles permite avaliar o efeito direto de PLA₂s sobre o pâncreas.

As PLA₂s exógenas provenientes de venenos ofídicos e de abelhas, e de pâncreas de mamíferos, são comumente utilizadas como ferramentas farmacológicas, pois apresentam grande homologia com as PLA₂s endógenas, reproduzindo muitos dos efeitos observados no processo inflamatório (Dennis, 1994; Gutierrez e Lomonte, 1995).

De modo geral, nossos resultados mostraram que a injeção de PLA₂s secretórias no ducto biliopancreático induziu inflamação do tecido pancreático associado à hiperamilasemia e comprometendo secundariamente o tecido pulmonar.

Inicialmente foi utilizada a piratoxina-I, um homólogo Lys-49 de PLA₂ secretória, encontrada no veneno de *Bothrops pirajai* (Toyama e col., 1995), desprovida de atividade catalítica. Dessa maneira, a injeção de piratoxina-I no ducto biliopancreático de ratos levou a um quadro de inflamação pancreática caracterizado por extravasamento de proteínas plasmáticas e influxo de neutrófilos, eventos que são mais evidentes nos tempos iniciais da pancreatite e que foram confirmados pela análise histológica. As alterações histológicas no

pâncreas incluíram edema intersticial e infiltrado de neutrófilos desde o tempo de 4 h, persistindo em tempos posteriores, mas com sinais de regeneração tecidual após 96 h da indução. Também foi observado necrose das células acinares após 24 h da indução.

Outro parâmetro bastante utilizado, tanto na clínica quanto na pesquisa experimental, é a dosagem da α -amilase sérica, uma enzima produzida pelo pâncreas cuja concentração no soro se encontra aumentada em casos de pancreatite aguda (Ranson, 1997; Yadav e col., 2002). Em nossos experimentos os níveis de amilase sérica também estavam aumentados 4 h após a injeção da piratoxina-I, mostrando que há comprometimento das células acinares após a injeção dessa PLA₂.

Clinicamente, a pancreatite aguda varia quanto ao grau de severidade, desde casos moderados até casos mais severos. Aproximadamente 25% dos pacientes que sofrem pancreatite enquadram-se nesses casos severos, e a doença pode evoluir para a síndrome conhecida como “síndrome da resposta inflamatória sistêmica” (SIRS) e, eventualmente, para uma situação denominada “síndrome da disfunção orgânica múltipla”, caracterizada por uma intensa lesão extrapancreática, que é a causa da maioria da mortalidade observada na pancreatite aguda (Bhatia, 2002). Nesse quadro, o principal órgão afetado é o pulmão, onde tanto a presença de enzimas ativadas derivadas do pâncreas quanto de leucócitos ativados devido ao quadro de SIRS (Guice e col., 1989; Alves Junior e col., 1996; Leme e col., 2002) podem levar a extensa injúria pulmonar, caracterizada principalmente por aumento de permeabilidade vascular nos alvéolos, edema pulmonar e migração de leucócitos para o interstício pulmonar (Bhatia, 2002; Pastor e col., 2003). No pulmão dos animais injetados com piratoxina-I, verificamos a existência de influxo de neutrófilos, medido através da atividade de MPO. Além disso, através da análise histológica, verificamos edema intersticial com concomitante diminuição do espaço alveolar, desde os tempos iniciais (4 h), até o último tempo estudado (96 h).

Esses resultados permitem afirmar que a pancreatite induzida pela piratoxina-I é caracterizada por (i) extravasamento de proteínas plasmáticas no pâncreas, (ii) influxo de neutrófilos para o pulmão, (iii) níveis elevados de amilase no soro e (iv) alterações morfológicas nos tecidos pancreático e pulmonar, sendo esses efeitos mais evidentes nos tempos iniciais da pancreatite.

A atividade inflamatória das PLA₂s não parece se restringir apenas à formação de metabólitos do ácido araquidônico, ou seja, à sua atividade catalítica. A utilização de PLA₂s destituídas de atividade catalítica tem contribuído para o entendimento dos mecanismos envolvidos na inflamação induzida por essas enzimas. Essas PLA₂s desprovidas de atividade catalítica estão presentes em venenos de várias serpentes; dentre elas, as do gênero *Bothrops*, na forma de Lys-49 PLA₂s, que são descritas como enzimas completamente desprovidas ou com pouca atividade catalítica, como é o caso da piratoxina-I. Outras PLA₂s homólogas encontradas nesses venenos são as Asp-49 PLA₂s e nesse caso, a substituição de um resíduo de lisina (Lys) na posição 49 pelo resíduo de aspartato (Asp) tem grande relevância para a atividade catalítica, porque a região da enzima que contém esse resíduo participa da alça para ligação ao cálcio, que é essencial para a catálise. Sendo assim, as PLA₂s Lys-49 não apresentam atividade catalítica, mas as Asp-49, também presentes na maioria dos venenos de serpentes, apresentam atividade catalítica variada (Gutiérrez e Lomonte, 1995).

Nesse trabalho, além da piratoxina-I, utilizamos a bothropstoxina-II, uma Asp-49 PLA₂, com atividade catalítica residual (Pereira e col., 1998). Trabalhos prévios mostraram que a capacidade edematogênica dessas enzimas é independente da atividade catalítica (Landucci e col., 1998, 2000; Castro e col., 2000; Zuliani e col., 2005), mas essa relação ainda não havia sido abordada no contexto da pancreatite aguda. Além dessas PLA₂s, ainda foi utilizada a PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique*, que possui alta atividade catalítica.

Dessa maneira, com a utilização dessas PLA₂s com diferentes atividades catalíticas, foi observado primeiramente que tanto a bothropstoxina-II quanto a PLA₂ *Naja mocambique mocambique* são capazes de induzir aumento de permeabilidade vascular com conseqüente extravasamento de proteínas plasmáticas no pâncreas, de forma semelhante à piratoxina-I. Além disso, verificamos que houve acentuado influxo de neutrófilos para o pâncreas em 4 h, que não é diferente do influxo causado pela injeção da piratoxina-I. Tanto o extravasamento de proteínas plasmáticas no pâncreas, quanto a presença de infiltrado neutrofílico nesse tecido, apontam para uma resposta inflamatória desencadeada pela injeção das PLA₂s de maneira desvinculada da atividade catalítica das mesmas. Embora a atividade catalítica não nos pareça relacionada diretamente aos efeitos inflamatórios locais,

as alterações pulmonares secundárias à pancreatite induzida pelas PLA₂s mostraram dependência com essa atividade. Foi observado que a injeção no ducto biliopancreático de piratoxina-I, bothropstoxina-II ou PLA₂ *Naja mocambique mocambique* causou aumentos significativos na atividade de MPO que são maiores para bothropstoxina-II e PLA₂ *Naja mocambique mocambique*, indicando que a atividade catalítica das mesmas influencia no acúmulo de neutrófilos no tecido pulmonar.

A lesão pulmonar, secundária à inflamação pancreática induzida pela injeção das PLA₂s, poderia ser causada por mediadores inflamatórios gerados no pâncreas ou em outros tecidos comprometidos pela inflamação pancreática, ou ainda, diretamente pelas enzimas ativadas derivadas do tecido pancreático que alcançaram a circulação.

Em concordância com essa última afirmação, foram detectados aumentos significativos dos níveis séricos de amilase para a piratoxina-I, bothropstoxina-II e PLA₂ *Naja mocambique mocambique* (44, 64 e 92%, respectivamente) indicando que quanto maior a atividade catalítica da PLA₂ injetada no ducto, maiores são os níveis de amilase séricos. Isso permite sugerir uma possível interação direta da PLA₂ injetada no pâncreas com as células acinares, para a secreção de enzimas digestivas. Para investigação dessa hipótese, foi padronizada a técnica de isolamento de ácinos pancreáticos e realizado o protocolo para dosagem da liberação de amilase dessas células.

O modelo de estimulação dos ácinos pancreáticos é amplamente utilizado para entender os mecanismos envolvidos na secreção por essas células, que se constitui como foco primário para indução da pancreatite aguda. Estímulos como agonistas colinérgicos (acetilcolina ou carbacol) e análogos de colecistocinina (ceruleína) estão entre os mais utilizados nesse contexto. Durante a padronização dessa técnica foram utilizados o carbacol e a ceruleína, e ambas as substâncias foram capazes de induzir liberação de amilase dos ácinos, sem comprometer a viabilidade dos mesmos, mostrando que a técnica foi padronizada adequadamente. Uma preocupação constante durante o procedimento de digestão com collagenase e isolamento dos ácinos pancreáticos foi verificar a viabilidade das células ao longo do processo, o que foi feito através de incubação com azul de Trypan, um procedimento prático, que permitiu verificar que os ácinos estavam viáveis antes da incubação com os estímulos. O ensaio de MTT foi utilizado para avaliar o efeito dos estímulos sobre a viabilidade dos ácinos durante a incubação. O procedimento de digestão e

isolamento, bem como tempo de incubação e composição dos tampões foram retirados e/ou adequados de trabalhos anteriores (Amsterdam e Jamieson, 1974a; Amsterdam e Jamieson, 1974b; Williams e col., 1978; Peikin e col., 1978; Bhatia e col., 2002; Linari e col., 2003). Uma dificuldade encontrada nos experimentos foi a contagem dos ácinos pancreáticos, que é impossibilitada devido à estrutura tridimensional dos agregados celulares, o que havia sido anteriormente comentado por Williams e col. (1978). Esse problema foi minimizado padronizando-se a distribuição dos ácinos obtidos de um pâncreas para uma suspensão final de volume fixo entre os experimentos, e a partir daí distribuindo-se para as placas. A expressão da liberação de amilase em valores percentuais em relação ao total também minimizou as eventuais variações nas quantidades de células. Assim, demonstramos que as PLA₂s induzem liberação de amilase dos ácinos pancreáticos, um efeito dependente da atividade catalítica das mesmas visto que a PLA₂ *Naja mocambique mocambique* induziu liberação de amilase em concentrações menores que as outras PLA₂s. A menor concentração de PLA₂ *Naja mocambique mocambique* que induziu liberação de amilase de maneira significativa foi 0,03 µg/mL, enquanto que para a bothropstoxina-II, essa concentração foi de 0,3 µg/mL e para a piratoxina-I foi de 1 µg/mL.

Adicionalmente, foi observado que concentrações mais altas das PLA₂s (10 µg/mL para bothropstoxina-II e 3-10 µg/mL para a PLA₂ de *Naja mocambique mocambique*) induziram liberações de amilase maiores do que 20%, ou seja, bastante elevadas em relação às observadas para o carbacol ou ceruleína. Ao avaliar a viabilidade dos ácinos pancreáticos ficou claro que essas concentrações elevadas causaram morte dos ácinos pancreáticos, provavelmente por necrose dessas células. Essa necrose é possivelmente dependente da atividade catalítica, pois não foi observada para a piratoxina-I, nas mesmas concentrações nas quais outras PLA₂s induziram esse efeito. Esse resultado é corroborado pela demonstração de que a lisolecitina, um produto da ação catalítica de PLA₂s, causa comprometimento da integridade de ácinos pancreáticos (Kimura e col., 1993; Mössner e col., 2000), que pode ter ocorrido nas concentrações mais altas de PLA₂s.

Outra comparação cabível nessa etapa do trabalho foi a utilização do tauracolato de sódio, um controle positivo para indução da pancreatite. A injeção desse sal biliar é capaz de causar pancreatite aguda hemorrágica e necrosante em ratos, com característica lesão pulmonar secundária (Aho e col., 1980). Foi observado que esse composto causa aumento

do extravasamento de proteínas plasmáticas e influxo de neutrófilos no pâncreas de maneira muito semelhante as PLA₂s. Por outro lado, o influxo de neutrófilos para o pulmão causado pela injeção de tauracolato de sódio foi 130 % maior do que aquele observado para a PLA₂ com maior atividade catalítica. De maneira semelhante, para os animais nos quais a pancreatite foi induzida com tauracolato de sódio, foram detectados níveis de amilase muito mais elevados (214%), o que sugere que a pancreatite induzida pelo tauracolato de sódio é mais severa em relação àquela induzida pelas PLA₂s no que se refere aos efeitos secundários. Assim, a utilização dessas PLA₂s no modelo de injeção no ducto biliopancreático mimetiza o quadro de pancreatite aguda humana e, dessa forma, pode permitir uma melhor compreensão sobre a natureza desta doença, bem como do seu tratamento.

A pancreatite é um processo multimediado, cuja patogênese tem a participação de diversos mediadores inflamatórios (Formela e col., 1995, Bhatia e col., 2000). Assim, após caracterizada a pancreatite induzida pelas PLA₂s foram utilizados diversos antagonistas ou inibidores do processo inflamatório, que serão discutidos à luz das evidências de sua participação em outros modelos de pancreatite.

Ethridge e col. (2002) descreveram que níveis protéicos e mRNA de COX-2 encontram-se aumentados durante a pancreatite. Além disso, em modelo de pancreatite induzida pela ceruleína, a inibição da COX-2, seja ela farmacológica ou pela utilização de animais geneticamente modificados, é capaz de diminuir a severidade da pancreatite em camundongos (Song e col., 2002). Em modelo de pancreatite induzida por administração intraperitoneal de L-arginina em ratos, foi demonstrado que a inibição da COX-2 diminui a lesão inflamatória sistêmica associada à pancreatite (O'Brien e col., 2005). Por outro lado, Slogoff e col. (2004) demonstraram que a inibição da COX-2 em camundongos não altera o perfil de produção de IL-6 e IL-1 β no soro e no pâncreas desses animais, apesar de diminuir a ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B), um fator de ativação nuclear que regula a expressão de genes que, por sua vez, codificam a expressão de várias proteínas, dentre elas, a COX-2.

Na pancreatite induzida pela PLA₂ *Naja mocambique mocambique*, o pré-tratamento com indometacina não modificou o extravasamento de proteínas plasmáticas, a atividade da MPO no pâncreas e os níveis elevados de amilase sérica. Entretanto, foi

observada uma diminuição da atividade de MPO no pulmão dos animais tratados, sugerindo que metabólitos da COX participam do influxo celular secundário pulmonar, mas não dos efeitos locais pancreáticos. O uso de um inibidor seletivo para COX-2, o celecoxib, mostrou inibição do extravasamento de proteínas plasmáticas pancreáticas, sem modificar o influxo de neutrófilos para o pâncreas, os níveis de amilase sérica e o influxo de neutrófilos no pulmão. Ethridge e col. (2002) demonstraram que as isoformas COX-1 e COX-2 possuem efeitos diferenciados em camundongos geneticamente modificados submetidos à pancreatite, ou seja, animais que não expressam a COX-1 apresentam exacerbação da inflamação no pâncreas e no pulmão, enquanto que animais que não expressam a COX-2 apresentam pancreatite menos grave, semelhante ao que ocorre nos animais normais tratados com inibidor seletivo de COX-2. Esta poderia ser uma possível explicação para o fato de a inibição seletiva COX-2 levar à diminuição do extravasamento de proteínas plasmáticas, que não é observado com a indometacina. Pode-se especular que na pancreatite induzida por PLA₂s secretórias, as isoformas de COX têm papéis diferenciados. Os resultados de atividade de MPO no pâncreas concordam com essa hipótese, pois há tendência a aumento (15%) com o tratamento com indometacina e tendência à diminuição (12%) com o tratamento com celecoxib. Contrariamente, o influxo de neutrófilos para o pulmão foi inibido pela indometacina mas não pelo celecoxib. Essa diferença entre pâncreas e pulmão para os inibidores de COX parece ser compreensível, visto que os efeitos pulmonares são secundários aos efeitos da PLA₂ secretória no pâncreas, desencadeando a geração de mediadores e enzimas digestivas, que através da corrente sanguínea alcançam o pulmão onde podem exercer atividade proinflamatória.

Existem evidências de que os derivados da 5-lipoxigenase têm importante participação no desenvolvimento da pancreatite aguda. Na pancreatite induzida pela ceruleína em camundongos deficientes de 5-lipoxigenase, foi observada atenuação do infiltrado de neutrófilos e da expressão de moléculas de adesão no pâncreas e no pulmão desses animais (Cuzzocrea e col., 2003). Na pancreatite aguda induzida pela injeção intraductal de tauracolato de sódio há aumento do infiltrado de neutrófilos e da quantidade de leucotrienos no pâncreas de ratos (Folch e col., 1998). Utilizando esse mesmo modelo de pancreatite, Kiriyama e col. (1993) já haviam demonstrado que o tratamento com AA861 (inibidor da 5-lipoxigenase) promove diminuição da pancreatite em ratos. Apesar dessas

evidências de participação dos metabólitos da 5-lipoxigenase em modelos de pancreatite, em nosso estudo, o tratamento com AA861 não alterou os parâmetros avaliados na pancreatite induzida pela PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique*, demonstrando que a 5-lipoxigenase não participa desse quadro de pancreatite.

Em 1988, Sirois e col. relataram que a injeção intravenosa ou intraperitoneal de PAF induz um aumento dose-dependente na permeabilidade vascular do pâncreas e do duodeno de ratos, podendo levar à pancreatite aguda. Sabe-se que os antagonistas dos receptores de PAF previnem o recrutamento de neutrófilos para o pâncreas e a síntese de leucotrieno B₄ nesse mesmo tecido (Hotter e col., 1997). Reduzem ainda a severidade da inflamação sistêmica na pancreatite induzida pela ceruleína em camundongos, por diminuírem os níveis séricos de TNF- α e de IL-1 β , a atividade de MPO no pulmão e a atividade de amilase no soro dos animais (Lane e col., 2001). Entretanto, o tratamento com antagonista de PAF mostrou-se ineficaz em melhorar a sobrevivência de ratos com pancreatite aguda grave e necrosante (Rivera e col., 1998). Nossos dados com o PCA4248 indicaram que o antagonismo dos receptores de PAF não promoveu alteração no extravasamento de proteínas plasmáticas no pâncreas dos animais com pancreatite induzida pela PLA₂. Na atividade de MPO no pâncreas desses animais foi encontrada uma tendência à diminuição, embora não tenha sido considerada estatisticamente diferente. Contudo, no pulmão dos animais tratados com este antagonista, foi observada uma diminuição estatisticamente diferente, o que aponta para um papel protetor no pulmão com o antagonismo dos receptores de PAF. Para a amilase sérica não foi encontrada alteração.

Lerch e col. (1995) avaliaram o efeito do Hoe 140 (icatibant), um antagonista do receptor B₂ de bradicinina, e demonstraram que esse antagonista previne a formação de edema induzido pela ceruleína. Dessa forma, sugeriram que a ativação do receptor B₂ está diretamente relacionada à formação de edema pancreático. De fato, na pancreatite induzida pela ceruleína em ratos, a formação de edema é mediada pela ação das cininas endógenas, conforme também verificado por Griesbacher e Lembeck (1992). O bloqueio da ação do receptor B₂ previne a formação de edema neste modelo de pancreatite (Griesbacher e col., 1995). Além disso, a inibição das caliceínas também pode contribuir para a diminuição da formação de edema induzida pela ceruleína (Griesbacher e col., 2002). Hirata e col. (2002) demonstraram que, em modelo de pancreatite induzida por ligação do ducto

biliopancreático, os animais tratados com antagonistas do receptor B₂, bem como ratos geneticamente modificados que não expressam esse receptor, apresentam diminuição no edema pancreático, o que concorda com os trabalhos anteriores. Além disso, estes autores também reportaram níveis diminuídos de amilase e lipase séricas, bem como menor dano do tecido pancreático nos animais tratados com antagonistas do receptor B₂. Esses trabalhos apontam para um papel importante dessa classe de mediadores vasoativos na pancreatite. O antagonismo do receptor B₂ de bradicinina durante a pancreatite induzida pela PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique*, causou diminuição do extravasamento de proteínas plasmáticas e da atividade de MPO no pâncreas, dos níveis de amilase sérica e da atividade de MPO no pulmão, indicando que a ativação do receptor B₂ é importante para os efeitos induzidos na pancreatite induzida por esta PLA₂. Cabe salientar ainda que este tratamento foi o único a causar diminuição de todos os parâmetros avaliados.

A substância P, agindo através do receptor NK₁ nas células endoteliais de vênulas pós-capilares, causa extravasamento de proteínas plasmáticas e infiltração de neutrófilos no tecido pancreático (Bhatia e col., 1998, Liddle e Nathan, 2004). No pâncreas é destacado um importante papel para a substância P, visto que as células acinares expressam receptores NK₁ (Jensen e col., 1984). É conhecido que tanto animais tratados com antagonistas do receptor NK₁, quanto camundongos geneticamente modificados que não expressam esse receptor, apresentam redução da severidade da pancreatite em diferentes modelos experimentais (Bhatia e col., 1998, Maa e col., 2000, Grady e col., 2000, Lau e col., 2005). Na pancreatite induzida pela PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique* foram observadas diminuições do extravasamento de proteínas plasmáticas e da atividade de MPO no pâncreas dos animais tratados com o antagonista NK₁ (SR140333). Para a atividade de MPO no pulmão e os níveis de amilase sérica não foram encontradas alterações significativas. Esses resultados mostram que a substância P tem participação na pancreatite induzida por essa PLA₂, mediando principalmente os efeitos observados no pâncreas. Apesar disso, o antagonismo dos receptores NK₁ não é suficiente para impedir a liberação de amilase induzida pela PLA₂ em questão.

Pode-se ainda estabelecer uma relação com os dados mostrando participação da substância P e da bradicinina, pois foi demonstrado que existe uma interação entre a formação de bradicinina e a estimulação de fibras sensoriais para a liberação dos

neuropeptídeos, sugerindo que a bradicinina poderia sensibilizar as fibras sensoriais a estímulos subseqüentes, reduzindo o limiar de ativação para a liberação da substância P e outros neuropeptídeos no pâncreas (Liang e col., 2001). Concordantemente, existem evidências de que a substância P participa da indução de extravasamento plasmático pela bradicinina no pâncreas, pois antagonistas do receptor NK₁ bloqueiam o efeito da bradicinina (Figini e col., 1997, Liddle e Nathan, 2004). Em nossos resultados os efeitos induzidos pelo icatibant foram mais expressivos do que aqueles induzidos pelo SR140333, concordando com essa hipótese.

O papel do NO na pancreatite aguda ainda é controverso. Werner e col. (1997) descreveram que doadores de NO são capazes de reduzir a formação de edema pancreático, a secreção de amilase e a ativação de tripsinogênio pancreático. Em concordância com esse trabalho, foi descrito que a inibição da síntese de NO por compostos não seletivos, como o L-NAME, exacerba os danos pulmonares associados à pancreatite aguda, que se traduz por um quadro de extravasamento microvascular e edema, associados a intenso infiltrado neutrofílico (O'Donovan e col., 1995; Werner e col., 1998). Outra evidência do papel protetor do NO foi relatada no modelo de pancreatite induzida por tauracolato, onde a inibição deste mediador pelo L-NAME diminuiu drasticamente a sobrevivência dos animais submetidos à pancreatite (Chen e col., 2004). Além disso, Dobosz e col. (2005) verificaram que o comprometimento da microcirculação pancreática durante a pancreatite induzida pela ceruleína pode ser agravado pela inibição do NO e melhorado pela administração de L-arginina. Entretanto, outros autores demonstraram que o NO proveniente da iNOS, apresenta efeito pró-inflamatório. Um e col. (2003) sugeriram que a inibição da iNOS reduz a lesão pancreática induzida pela ceruleína. Somando-se a isto, Leindler e col. (2004) demonstraram que a ativação da iNOS correlaciona-se com a lesão observada no pâncreas e no pulmão de animais submetidos à pancreatite induzida por tauracolato de sódio e, simultaneamente, à isquemia e reperfusão pancreática. Finalmente, também foi verificado que camundongos deficientes de iNOS apresentam redução da inflamação e lesão no pâncreas, da expressão de moléculas de adesão, da presença de nitrotirosina, de peroxidação lipídica e do dano no DNA em modelo de pancreatite induzida pela ceruleína (Cuzzocrea e col., 2002).

Na pancreatite induzida por PLA₂ do veneno de *Naja mocambique mocambique*, o tratamento agudo com L-NAME levou à diminuição do extravasamento de proteínas plasmáticas no pâncreas, que pode ser explicada pela perda da vasodilatação arteriolar pancreática via inibição da síntese do NO. No entanto, essa diminuição foi acompanhada de um aumento na atividade de MPO nesse mesmo tecido, indicando um influxo exacerbado de neutrófilos para o pâncreas provocado pela inibição não seletiva do NO. No tecido pulmonar dos animais tratados com L-NAME, não houve alteração da atividade de MPO e os níveis de amilase sérica também não foram alterados por este tratamento, apesar de ter sido observada uma tendência a maiores valores. Foi utilizado também o tratamento com a aminoguanidina, um inibidor cerca de 11 vezes mais seletivo para iNOS em comparação à eNOS (Alderton e col., 2001). Esse tratamento não modificou o extravasamento de proteínas plasmáticas e influxo de neutrófilos no pâncreas, o influxo de neutrófilos para o pulmão ou os níveis de amilase sérica. Resultados semelhantes foram observados por Nishino e col. (1999) na pancreatite induzida por ligação do ducto biliar, onde os autores utilizaram ambos, L-NAME e aminoguanidina, e observaram exacerbação da pancreatite nos animais tratados com L-NAME, mas ausência de efeito com a aminoguanidina. Obviamente, há algumas considerações que podem ser feitas em relação ao tratamento com aminoguanidina, visto que esse inibidor não é altamente seletivo para iNOS, como o é, por exemplo, o 1400W, cuja seletividade é cerca de 4000 vezes maior para iNOS em relação à eNOS (Alderton e col., 2001). Sendo assim, não podemos descartar a possibilidade de que a falta de efeitos da aminoguanidina seja devida, em menor escala, à inibição da eNOS. De qualquer modo, os resultados obtidos permitem sugerir que durante a pancreatite aguda induzida pela PLA₂ o NO proveniente das isoformas constitutivas exerce um efeito protetor via manutenção da perfusão pancreática, enquanto que o NO proveniente da iNOS exerce um papel agressor. Um estudo recente realizado por DiMagno e col. (2004) mostrou claramente que a eNOS tem um papel protetor no início da pancreatite aguda induzida pela ceruleína, pois tanto camundongos com nocaute para eNOS, quanto animais tratados com N^ω-nitro-L-arginina (inibidor não seletivo das NOS) apresentam aumento da atividade de tripsina, da concentração sérica de lipase e do peso líquido do pâncreas, os quais foram acompanhados pela diminuição do fluxo sanguíneo pancreático nos tempos iniciais (15min-1h) da pancreatite. Além disso, Ahluwalia e col. (2004) demonstraram, através do uso de

camundongos com nocaute para eNOS, que a ausência do NO proveniente da eNOS leva a menor ativação da guanilil ciclase solúvel e conseqüentemente menor produção de GMP cíclico, resultando em maior expressão de P-selectina no endotélio do leito mesentérico vascular, o que colabora para maior recrutamento de neutrófilos nesses animais. Essa idéia reforça os resultados mostrando que apesar de ser observado menor extravasamento de proteínas plasmáticas, o influxo de neutrófilos para o pâncreas foi maior quando comparado ao grupo controle; entretanto, outros experimentos seriam necessários para avaliar essa possibilidade.

Níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, encontram-se aumentados durante a pancreatite aguda, sendo correlacionados com a severidade da inflamação pancreática (Norman e col., 1995a, Kusske e col., 1996). Dentre estas citocinas, o TNF- α é de grande importância, pois pode induzir a síntese e liberação de outras citocinas (Closa e col., 1999). Durante a pancreatite aguda ocorre expressão pancreática do gene de TNF- α , indicando que essa citocina é produzida nos primeiros estágios da doença (Norman e col., 1995b). O tratamento com anticorpos anti-TNF- α ou o bloqueio de sua síntese com pentoxifilina pode ter efeitos benéficos na pancreatite aguda induzida pela ceruleína (Grewal e col., 1994, Gómez-Cambronero e col., 2000), porém, em casos de pancreatite mais grave, a inibição da síntese de TNF- α parece não ser suficiente para prevenir o quadro inflamatório (Bassi e col., 1994). Nesse sentido, Pereda e col. (2004) demonstraram que a pancreatite induzida por tauracolato de sódio é parcialmente inibida pela pentoxifilina ou revertida pela associação do tratamento com pentoxifilina a compostos que previnem o estresse oxidativo (inibidores da xantina oxidase). Na pancreatite induzida pela PLA₂ foi verificado um aumento na produção de TNF- α sérico. O tratamento com pentoxifilina reduziu o extravasamento de proteínas plasmáticas no pâncreas e a atividade de MPO no pulmão. Por outro lado, os níveis de amilase sérica não foram alterados por esse tratamento confirmando trabalho prévio em modelo de pancreatite induzida por obstrução do ducto pancreático (Marton e col., 1998). Esses resultados sugerem que na pancreatite induzida pela PLA₂ o TNF- α medeia o extravasamento de proteínas plasmáticas no pâncreas e o influxo de neutrófilos no pulmão.

A partir daí, foi estudado o efeito dos diversos antagonistas/inibidores utilizados sobre os níveis séricos dessa citocina. Foi observado que o tratamento com pentoxifilina

reduziu os níveis de TNF- α , conforme esperado. Resultados semelhantes foram observados por Gómez-Cambronero e col. (2000) durante a pancreatite induzida por ceruleína. Neste mesmo trabalho, os autores observaram diminuição do edema, o que se assemelha bastante aos resultados obtidos com a pancreatite induzida pela PLA₂. Além disso, Pereda e col. (2004) mostraram que a pancreatite induzida por tauracolato de sódio é parcialmente inibida pela pentoxifilina. Também foi observada diminuição nos níveis de TNF- α com os tratamentos com SR140333 e icatibant demonstrando que, respectivamente, os receptores NK₁ e B₂ estão envolvidos na liberação dessa citocina próinflamatória. É possível, portanto que os efeitos benéficos destes antagonistas sejam devidos à redução dos níveis de TNF- α . Em relação aos metabólitos do ácido araquidônico, o tratamento com indometacina diminuiu os níveis de TNF- α , o que não foi verificado com o celecoxib. Isto sugere que na pancreatite induzida pela PLA₂, a produção do TNF- α não tem relação direta com a COX-2. De modo similar, Slogoff e col. (2004) descreveram que um inibidor de COX-2 (SC58-125), apesar de diminuir a expressão de NF- κ B, não alterou os níveis séricos de citocinas próinflamatórias. A inibição dos receptores de PAF também levou à diminuição dos níveis séricos de TNF- α . Para o tratamento com AA861, no entanto, não foi observada alteração nos níveis de TNF- α , sugerindo que a via da lipoxigenase não é importante para a produção dessa citocina, bem como para os demais parâmetros avaliados. Em relação ao papel do NO na produção de TNF- α , apenas o tratamento com L-NAME resultou em diminuição dos níveis dessa citocina. Para a aminoguanidina não foram observadas diferenças nos níveis de TNF- α . Apesar de os resultados com o L-NAME sugerirem uma piora no quadro de pancreatite, os níveis de TNF- α mostram-se reduzidos nestes animais. Existe evidências que na pancreatite grave diversas proteases podem inativar o TNF- α por clivagem proteolítica (Alsfasser e col., 2005), ou seja, pode-se especular que a ausência do NO e a aparente piora do quadro de pancreatite leva a aumento da liberação dessas proteases, afetando os níveis de TNF- α .

Em resumo, os dados obtidos através dos tratamentos com antagonistas/inibidores farmacológicos diversos permitem sugerir que a PLA₂ induz pancreatite que é caracterizada por:

i) alterações no extravasamento de proteínas plasmáticas que contam com a participação dos substância P, bradicinina, NO (via NOS constitutivas, provavelmente eNOS), TNF- α e mediadores lipídicos derivados da COX-2;

ii) presença de infiltrado de neutrófilos no pâncreas, que é diminuído pelo antagonismo dos receptores B₂ e NK₁ e aumentado pela inibição da síntese de NO derivado das isoformas constitutivas;

iii) influxo de neutrófilos para o pulmão, onde ocorre a participação dos receptores B₂ e de PAF, dos metabólitos da COX-1 (sem aparente participação da COX-2) e do TNF- α ;

iv) aumento dos níveis séricos de amilase, onde apenas a inibição do receptor B₂ foi capaz de modular negativamente esses valores;

v) níveis elevados de TNF- α que podem ser diminuídos pelo antagonismo dos receptores B₂ e NK₁, além da síntese de NO pela eNOS e pela própria inibição farmacológica da síntese de TNF- α .

Em resumo, nossos resultados mostram que fisiopatologia da pancreatite induzida pelas PLA₂s é complexa, à semelhança da clínica e de outros modelos experimentais. Entretanto, o presente modelo de pancreatite oferece a vantagem de uma compreensão mais precisa do papel das PLA₂s no desenvolvimento dessa doença. Futuros estudos possibilitarão novas abordagens terapêuticas para o tratamento desta doença.

6. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Nossos resultados nos permitem concluir que:

- i. As PLA₂s secretórias são capazes de induzir pancreatite aguda em ratos quando injetadas no ducto biliopancreático, um quadro caracterizado por efeitos inflamatórios locais e secundários, que é mais evidente nos tempos iniciais.
- ii. A atividade catalítica das PLA₂s não é importante na indução dos efeitos inflamatórios locais na pancreatite, mas participa na indução dos efeitos secundários induzidos pelas PLA₂s injetadas no pâncreas, provavelmente devido à liberação de enzimas proteolíticas pelos ácinos pancreáticos.
- iii. A mediação farmacológica da pancreatite induzida pelas PLA₂s envolve vários fatores como cininas, neuropeptídeos, NO, TNF- α , PAF e metabólitos das COX.

De modo geral, pode-se afirmar que a pancreatite aguda induzida pelas PLA₂s reproduz algumas alterações observadas na pancreatite aguda em humanos, representando uma nova estratégia de estudo do papel das PLA₂s na pancreatite aguda.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahluwalia A, Foster P, Scotland RS, McLean, PG, Mathur A, Perretti M, Moncada S, Hobbs AJ. Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP-dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci*; 2004; 101(5):1386-91.

Aho HJ, Koskensalo SML, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. *Scand J Gastroent*; 1980; 15: 411-16.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*; 2001; 357(3):593-615.

Alsfasser G, Antoniu B, Thayer SP, Warshaw AL, Fernandez-del Castillo C. Degradation and inactivation of plasma tumor necrosis factor-alpha by pancreatic proteases in experimental acute pancreatitis. *Pancreatology*; 2005; 5(1):37-43.

Alves Jr A, Coelho AMM, Sampetre SN, Kubrusly MS, Molan NAT, Leite KRM, Jancar S, Machado MCC, Pinotti HW. Fisiopatologia da lesão pulmonar na pancreatite aguda. *Rev. Hosp Clin Fac Med S Paulo*, 1996; 51(6), 232-8.

Amsterdam A, Jamieson JD. Studies on dispersed pancreatic exocrine cells. I. Dissociation technique and morphologic characteristics of separated cells. *J Cell Biol*, 1974a; 63(3):1037-56.

Amsterdam A, Jamieson JD. Studies on dispersed pancreatic exocrine cells. II. Functional characteristics of separated cells. *J Cell Biol*; 1974b; 63(3):1057-73.

Anderson BO, Moore MD, Banerjee A. Phospholipase A₂ regulates critical inflammatory mediators of multiple organ failure. *J Surg Res*, 1994; 56: 199-205.

Baggioloni M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1 interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 84:1045-1049.

Bassi DG, Foitzik T, Rattner DW, Lewandrowski K, Warshaw AL, Fernandez-del Castillo C. Failure of pentoxifylline to ameliorate severe acute pancreatitis in the rat: results of a prospective, randomized, controlled study. *Crit Care Med* 1994; 22(12):1960-3.

Bhatia M, Brady M, Kang YK, Costello E, Newton DJ, Christmas SE, Neoptolemos JP, Slavin J. MCP-1 but not CINC synthesis is increased in rat pancreatic acini in response to cerulein hyperstimulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282(1):G77-85.

Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 2000; 190:117-25.

Bhatia M, Saluja AK, Holbauer B, Frossard JL, Lee HS, Castagliuolo I, Wang CC, Gerard N, Phoulakis C, Steer ML. Role of substance P and the neurokinin 1 receptor in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4760-5.

Bhatia M, Wong FL, Cao Y, Lau HY, Huang J, Puneet P, Chevali L. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology* 2005; 5:132-44

Bhatia M. Novel therapeutic targets for acute pancreatitis and associated multiple organ dysfunction syndrome. *Current Drug Targets Inflammation Allergy* 2002; 1:343-51.

Blinman TA, Gukovsky I, Mouria M, Zaninovic V, Livingston E, Pandol SJ, Gukovskaya AS. Activation of pancreatic acinar cells on isolation from tissue: cytokine upregulation via p38 MAP kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279(6):C1993-2003.

Bradley PP, Priebat MD, Christensen MD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 1982; 78:206-9.

Brain S, Lewis GP, Whittle BJ. Actions of phospholipase-A₂ on mast-cell histamine release and paw oedema in the rat. *Br J Pharmacol* 1977; 59(3):440P-1P.

- Brain SD, Williams TJ. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br J Pharmacol* 1985; 86:855-860
- Buchler M, Malfertheiner P, Schadlich H, Nevalainen TJ, Friess H, Beger HG. Role of phospholipase A₂ in human acute pancreatitis. *Gastroenterol* 1989; 97(6):1521-6.
- Canaan S, Zadori Z, Ghomashchi F, Bollinger J, Sadilek M, Moreau ME, Tijssen P, Gelb MH. Interfacial enzymology of parvovirus phospholipases A₂. *J Biol Chem* 2004; 279(15):14502-8.
- Castro RC, Landucci ECT, Toyama MH, Giglio JR, Marangoni S, De Nucci G, Antunes E. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A₂ into the rat pleural cavity. *Toxicon* 2000; 38:1773-85.
- Chaudhuri A, Kolodecik TR, Gorelick FS. Effects of increased intracellular cAMP on carbachol-stimulated zymogen activation, secretion, and injury in the pancreatic acinar cell. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288(2):G235-43.
- Chen CC, Wang SS, Tsay SH, Lee FY, Lu RH, Chang FY, Lee SD Effects of nitric oxide synthase inhibitors on retrograde bile salt induced pancreatitis rats. *J Chin Med Assoc* 2004; 67(1):9-14.
- Cirino G, Peers SH, Wallace JL, Flower RJ. A study of phospholipase A₂-induced oedema in rat paw. *Eur J Pharmacol* 1989; 166, 505-10.
- Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB. Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via direct action on the NADPH oxidase. *J Clin Invest* 1992; 90:1116-21.
- Closa D, Hotter G, Prats N, Gelpi E, Rosello-Catafau J. A bradykinin antagonist inhibited nitric oxide generation and thromboxane biosynthesis in acute pancreatitis. *Prostaglandins* 1995; 49(5):285-94.

Costa SKP, Esquisatto LCM, Camargo E, Gambero A, Brain SD, De Nucci G, Antunes E. Comparative effect of *Phoneutria nigriventer* spider venom and capsaicin on the rat paw oedema. *Life Science* 2001; 69: 1573-85.

Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Centorrino T, Ciccolo A, Van de Loo FA, Britti D, Caputi AP, Thiernemann C. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice exhibit resistance to the acute pancreatitis induced by cerulein. *Shock* 2002; 17(5):416-22.

Cuzzocrea S, Rossi A, Serraino I, Di Paola R, Dugo L, Genovese T, Britti D, Sciarra G, De Sarro A, Caputi AP, Sautebin L. 5-lipoxygenase knockout mice exhibit a resistance to acute pancreatitis induced by cerulein. *Immunology* 2003; 110(1):120-30.

Damerau B, Lege L, Oldigs HD, Vogt W. Histamine release, formation of prostaglandin-like activity (SRS-C) and mast cell degranulation by the direct lytic factor (DLF) and phospholipase A of cobra venom. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmac* 1975; 287, 141-56.

Dangelo JG, Fattini CA. Anatomia básica dos sistemas orgânicos. *Ed Atheneu* 1995; 131-2.

Davidson FF, Dennis EA. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A₂ from snake venom to human secreted forms. *J Mol Evol* 1990; 31:228-238

Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br F Surg* 1995; 82:1598-1610.

Dawra R, Sherif R, Phillips PA, Dudeja V, Dhoulakhandi D, Saluja AK. Development of a new mouse model of acute pancreatitis induced by administration of L-arginine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; *in press*.

de Dios I, Perez M, de La Mano A, Sevillano S, Orfao A, Ramudo L, Manso MA. Contribution of circulating leukocytes to cytokine production in pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis in rats. *Cytokine* 2002; 20(6):295-303.

Dennis EA. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1994; 269:13057-60.

DiMagno MJ, Williams JA, Hao Y, Ernst SA, Owyang C. Endothelial nitric oxide synthase is protective in the initiation of caerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287(1):G80-7.

Dobosz M, Hac S, Mionskowska L, Dymecki D, Dobrowolski S, Wajda Z. Organ microcirculatory disturbances in experimental acute pancreatitis. A role of nitric oxide. *Physiol Res* 2005; 54:363-8.

Draheim SE, Bach NJ, Dillard RD. Indole inhibitors of human nonpancreatic secretory phospholipase A₂. *J Med Chem*, 1996; 39, 5159-75.

Ethridge RT, Chung DH, Slogoff M, Ehlers RA, Hellmich MR, Rajaraman S, Saito H, Uchida T, Evers BM. Cyclooxygenase-2 gene disruption attenuates the severity of acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology* 2002; 123(4):1311-22.

Figini M, Emanuelli C, Grady EF, Kirkwood K, Payan DG, Ansel J, Gerard C, Geppetti P, Bunnett N. Substance P and bradykinin stimulate plasma extravasation in the mouse gastrointestinal tract and pancreas. *Am J Physiol* 1997; 272:G785-93.

Filliatre LG, Sayah S, Latournerie V, Renaud JF, Finet M, Hanf R. Cyclo-oxygenase and lipoxygenase pathways in mast cell dependent-neurogenic inflammation induced by electrical stimulation of the rat saphenous nerve. *Br J Pharmacol* 2001; 132:1581-89.

Flower RJ, Blackwell GJ. The importance of phospholipase A₂ in prostaglandin biosynthesis. *Biochem Pharmacol* 1976; 25(3):285-91.

Folch E, Closa D, Prats N, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Leukotriene generation and neutrophil infiltration after experimental acute pancreatitis. *Inflammation* 1998; 22(1):83-93.

Formela LJ, Galloway SW, Kingsnorth AN. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1995; 82:6-13.

Fox N, Song M, Scherementi J, Sharp JD, White DL, Snyder DW, Hartley LW, Carlson DG, Bach NJ, Dillard RD, Draheim SE, Bobbitt JL, Fisher L, Mihelich ED. Transgenic model for the discovery of novel human secretory non-pancreatic phospholipase A₂ inhibitors. *Eur J Pharmacol* 1996; 308, 195-203.

Franco-Penteado CF, Desouza IA, Teixeira AS, De Nucci G, Ribeiro-Dasilva G, Antunes E. Involvement of nitric oxide on the peritoneal neutrophil influx induced by staphylococcal enterotoxin B in mouse. *Toxicon* 2001; 39, 1383-6.

Fremont DH, Anderson DH, Wilson IA, Dennis EA, Xuong NH. Crystal structure of phospholipase A₂ from Indian cobra reveals a trimeric association. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(1):342-6.

Furue S, Mikawa K, Nishina K, Shiga M, Ueno M, Tomita Y, Kuwabara K, Teshirogi I, Ono T, Hori Y, Matsukawa A, Yoshinaga M, Obara H. Therapeutic time-window of a group IIA phospholipase A₂ inhibitor in rabbit acute lung injury: correlation with lung surfactant protection. *Crit Care Med* 2001; 29(4), 719-27.

Gaboury J, Woodman RC, Granger DN, Reinhardt P, Kubes P. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide and mast cells. *Am J Physiol* 1993; 265:H862-7.

Gambero A, Landucci ECT, Cintra ACO, De Nucci G, Antunes E. Signalling pathways regulating human neutrophil chemotaxis induced by secretory phospholipases A₂. *Toxicon* 2004; 44:473-8.

Gambero A, Landucci ECT, Toyama MH, Marangoni S, Giglio JR, Nader HB, Dietrich CP, De Nucci G, Antunes E. Human neutrophil migration in vitro induced by secretory phospholipases A₂: a role for cell surface glycosaminoglycans. *Biochem Pharmacol* 2002; 63(1):65-72.

Gardner J. Regulation of pancreatic exocrine function in vitro: Initial steps in the actions of secretagogues. *Annu Rev Physiol* 1979; 41:55-66.

Gautam D, Han SJ, Heard TS, Cui Y, Miller G, Bloodworth L, Wess J. Cholinergic stimulation of amylase secretion from pancreatic acinar cells studied with muscarinic acetylcholine receptor mutant mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 313(3):995-1002.

Gelb MH, Valentini E, Ghomashchi F, Lazdunskii M, Lambeau G. Cloning and recombinant expression of a structurally novel human secreted phospholipase A₂. *J Biol Chem* 2000; 275(51):39823–6.

Gomez-Cambronero L, Camps B, de La Asunción JG, Cerda M, Pellin A, Pallardo FV, Calvete J, Sweiry JH, Mann GE, Vina J, Sastre J. Pentoxifylline ameliorates cerulein-induced pancreatitis in rats: role of glutathione and nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293(2):670-6.

Grady EF, Yoshimi SK, Maa J, Valeroso D, Vartanian RK, Rahim S, Kim EH, Gerard C, Gerard N, Bunnett NW, Kirkwood KS. Substance P mediates inflammatory oedema in acute pancreatitis via activation of the neurokinin-1 receptor in rats and mice. *Br J Pharmacol* 2000; 130(3):505-12.

Grady T, Mah'Moud M, Otani T, Rhee S, Lerch MM, Gorelick FS. Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury. *Am J Physiol* 1998; 275:G1010-7.

Grewal HP, Mohey el Din A, Gaber L, Kotb M, Gaber AO. Amelioration of the physiologic and biochemical changes of acute pancreatitis using an anti-TNF-alpha polyclonal antibody. *Am J Surg* 1994; 167(1):214-8.

Griesbacher T, Kolbitsch C, Tiran B, Lembeck F. Effects of the bradykinin antagonist, icatibant (Hoe 140), on pancreas and liver functions during and after caerulein-induced pancreatitis in rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1995; 352(5):557-64.

Griesbacher T, Lembeck F. Effects of the bradykinin antagonist, HOE 140, in experimental acute pancreatitis. *Br J Pharmacol* 1992; 107(2):356-60.

Griesbacher T, Rainer I, Tiran B, Evans DM. Involvement of tissue kallikrein but not plasma kallikrein in the development of symptoms mediated by endogenous kinins in acute pancreatitis in rats. *Br J Pharmacol* 2002; 137(5):692-700.

Gross V, Andeessen, R, Leser HG. Interleukin-8 and neutrophil activation in acute pancreatitis. *Eur J Clin Invest* 1992; 22:200-3.

Guice KS, Oldham KT, Caty MG, Johnson KJ, Ward PA. Neutrophil-dependent, oxygen-radical mediated lung injury associated with acute pancreatitis. *Ann Surg* 1989; 210:740-7.

Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venom. *Toxicon* 1995; 33(11):1405-1424.

Hanasaki K, Arita H. Characterization of a high affinity binding site for pancreatic-type phospholipase A₂ in the rat. Its cellular and tissue distribution. *J Biol Chem* 1992; 267(9):6414-20.

Heinrikson RL, Krueger ET, Keim PS. Amino acid sequence of phospholipase A₂ from the venom of *Crotalus adamanteus*. A new classification of phospholipase A based upon structural determinants. *J Biol Chem* 1977; 252:4913-21.

Hietaranta A, Kemppainen E, Puolakkainen P, Sainio V, Haapiainen R, Peuravuori H, Kivilaakso E, Nevalainen T. Extracellular phospholipases A₂ in relation to systemic inflammation response syndrome (SIRS) and systemic complications in severe acute pancreatitis. *Pancreas* 1999; 18(4):285-91.

Hirata M, Hayashi I, Yoshimura K, Ishii K, Soma K, Ohwada T, Kakita A, Majima M. Blockade of bradykinin B(2) receptor suppresses acute pancreatitis induced by obstruction of the pancreaticobiliary duct in rats. *Br J Pharmacol* 2002; 135(1):29-36.

Hotter G, Closa D, Prats N, Pi F, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Free radical enhancement promotes leukocyte recruitment through a PAF and LTB₄ dependent mechanism. *Free Radic Biol Med* 1997; 22(6):947-54.

Jancar S, De Giaccobi G, Mariano M, Mencia-Huerta JM, Sirois P, Braquet P. Immune complex induced pancreatitis: effect of BN 52021, a selective antagonist of platelet-activating factor. *Prostaglandins*. 1988 May;35(5):757-70.

Jensen RT, Jones SW, Lu YA, Xu JC, Folkers K, Gardner, JD. Interaction of substance P antagonists with substance P receptors on dispersed pancreatic acini. *Biochim Biophys Acta* 1984; 804(2):181-91.

Kazanjian KK, Towfigh S, McFadden DW. Peptide YY exhibits a mitogenic effect on pancreatic cells while improving acute pancreatitis in vitro. *J Surg Res* 2003; 114(1):95-9.

Kimura W, Secknus R, Fischbach W, Mossner J. Role of phospholipase A₂ in pancreatic acinar cell damage and possibilities of inhibition: studies with isolated rat pancreatic acini. *Pancreas* 1993; 8(1):70-9.

Kini RM, Evans HJ. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon* 1989; 27(6):613-35.

Kiriyama M, Izumi R, Miyazaki I. Protective effect of AA-861 (5-lipoxygenase inhibitor) on experimental acute necrotizing pancreatitis in rats. *Int J Pancreatol* 1993; 13(3):201-8.

Kubes P, Susuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leucocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:4651-55.

Kusske AM, Rongione AJ, Reber HA. Cytokines and acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1996; 110(2):639-42.

Lambeau G, Lazdunski M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂. *TiPS* 1999; 20:162-70.

Lampel M, Kern H. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue *Virchows Archiv* 1977; 373:97-117.

Landucci EC, de Castro RC, Toyama M, Giglio JR, Marangoni S, De Nucci G, Antunes E. Inflammatory oedema induced by the lys-49 phospholipase A(2) homologue piratoxin-I in

the rat and rabbit. Effect of polyanions and p-bromophenacyl bromide. *Biochem Pharmacol* 2000; 59(10):1289-94.

Landucci ECT, Pereira MF, Cintra ACO, Giglio JR, Marangoni S, Oliveira B, Cirino G, Antunes E, De Nucci G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: Dissociation between enzymatic and biological activities. *Eur J Pharmacol* 1998; 343: 257-263.

Lane JS, Todd KE, Gloor B, Chandler CF, Kau AW, Ashley SW, Reber HA, McFadden DW. Platelet activating factor antagonism reduces the systemic inflammatory response in a murine model of acute pancreatitis. *J Surg Res* 2001; 99(2):365-70.

Lau HY, Wong FL, Bhatia M. A key role of neurokinin 1 receptors in acute pancreatitis and associated lung injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 327(2):509-15.

Leindler L, Morschl E, Laszlo F, Mandi Y, Takacs T, Jarmai K, Farkas G. Importance of cytokines, nitric oxide, and apoptosis in the pathological process of necrotizing pancreatitis in rats. *Pancreas* 2004; 29(2):157-61.

Leme AS, Lichtenstein A, Arantes-Costa F, Landucci ECT, Martins MA. Acute lung injury in experimental pancreatitis in rats: pulmonary protective effects of crotaipotin and N-acetylcysteine. *Shock* 2002; 18(5):428-33.

Lerch MM, Weidenbach H, Gress TM, Adler G. Effect of kinin inhibition in experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1995; 269(4.1):G490-9.

Leser HG, Gross C, Scheibenbogen C. Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterol* 1991; 101:782-5.

Leung PS, Ip SP. Pancreatic acinar cell: its role in acute pancreatitis. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38(7):1024-30.

Liang YF, Haake B, Reeh PW. Sustained sensitization and recruitment of rat cutaneous nociceptors by bradykinin and a novel theory of its excitatory action. *J Physiol* 2001; 532(1); 229-39.

Liddle RA, Nathan JD. Neurogenic inflammation and pancreatitis. *Pancreatology* 2004; 4(6):551-9.

Linari G, Improta G, Agostini S, Andreassi A, Broccardo M. Stimulatory effect of PG-KII, an NK3 tachykinin receptor agonist, on isolated pancreatic acini: species-related differences. *Peptides* 2004; 25(1):45-51.

Lombardi B, Estes LW, Longnecker DW. Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with a choline-deficient diet. *Am J Pathol* 1975; 79, 465-80.

Maa J, Grady EF, Yoshimi SK, Drasin TE, Kim EH, Hutter MM, Bunnett NW, Kirkwood KS. Substance P is a determinant of lethality in diet-induced hemorrhagic pancreatitis in mice. *Surgery* 2000; 128(2):232-9.

Marton J, Farkas G, Takacs T, Nagy Z, Szasz Z, Varga J, Jarmay K, Balogh A, Lonovics J. Beneficial effects of pentoxifylline treatment of experimental acute pancreatitis in rats. *Res Exp Med (Berl)* 1998; 197(5):293-9.

Mizunuma T, Kawamura S, and Kishino Y. Effects of injecting excess arginine on rat pancreas. *J Nutr* 1984; 114: 467–71.

Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329, 2002-12.

Mosior M, Six DA, Dennis EA. Group IV cytosolic phospholipase A₂ binds with high affinity and specificity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate resulting in dramatic increases in activity. *J Biol Chem* 1998; 273(4):2184-91.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2):55-63.

Mossner J, Wessig C, Ogami Y, Keim V. Role of various phospholipases A₂ and inhibitors in the pathogenesis and prevention of pancreatic acinar cell necrosis: studies with isolated rat pancreatic acini. *Int J Pancreatol* 2000; 27(1):29-38.

Murakami M, Nakatani Y, Hara N, Kudo I, Inoue K. Role of phospholipase A₂ in mast cell activation and function. In: Glaser K.B, Vadas P. Phospholipase A₂. In: *Clinical Inflammation: Molecular Approches to Pathophysiology*, New York, CRC Press vol. 5: 93-124.

Nishino T, Watanabe S, Oyama H, Fukuya Y, Hayashi N, Kobayashi M. An endothelial nitric oxide synthase inhibitor aggravates CDL-induced acute pancreatitis in rats. *Pancreas* 1999; 19(4):390-400.

Norman J, Franz M, Messina J, Riker A, Fabri PJ, Rosemurgy AS, Gower WRJr. Interleukin-1 receptor antagonist decreases severity of experimental acute pancreatitis. *Surgery* 1995a, 117(6):648-55.

Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1998; 175:76-83.

Norman JG, Fink GW, Denham W, Yang J, Carter G, Sexton C, Falkner J, Gower WR, Franz MG. Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis. A probable mechanism for distant organ dysfunction. *Dig Dis Sci* 1997; 42(8):1783-8.

Norman JG, Fink GW, Franz MG. Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. *Arch Surg* 1995b; 130(9):966-70.

O'Brien G, Shields CJ, Winter DC, Dillon JP, Kirwan WO, Redmond HP. Cyclooxygenase-2 plays a central role in the genesis of pancreatitis and associated lung injury. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4(1):126-9.

O'Donovan DA, Kelly CJ, Abdih H, Bouchier-Hayes D, Watson RWG, Redmond HP, Burke PE, Bouchier-Hayes DA. Role of nitric oxide in lung injury associated with experimental acute pancreatitis. *Br J Surgery* 1995; 82, 1122-1126.

Oruc N, Yukselen V, Ozutemiz AO, Yuce G, Celik HA, Musoglu A, Batur Y. Leukotriene receptor antagonism in experimental acute pancreatitis in rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16(4):383-8.

Pastor CM, Matthay MA, Frossard JL. Pancreatitis-associated acute lung injury. *CHEST* 2003; 124:2341-51.

Patto RJ, Vinayek R, Jensen RT, Gardner JD. Carbachol does not down-regulate substance P receptors in pancreatic acini. *Pancreas* 1992; 7:447-52.

Peikin SR, Rottman AJ, Batzri S, Gardner JD. Kinetics of amylase release by dispersed acini prepared from guinea pig pancreas. *Am J Physiol* 1978; 235(6):E743-9.

Pereda J, Sabater L, Cassinello N, Gomez-Cambronero L, Closa D, Folch-Puy E, Aparisi L, Calvete J, Cerda M, Lledo S, Vina J, Sastre J. Effect of simultaneous inhibition of TNF-alpha production and xanthine oxidase in experimental acute pancreatitis: the role of mitogen activated protein kinases. *Ann Surg* 2004; 240(1):108-16.

Pereira MF, Novello JC, Cintra AC, Giglio JR, Landucci ECT, Oliveira B, Marangoni S. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (Jararacucu) venom with low phospholipase A₂ activity. *J Protein Chem* 1998; 17:381-6.

Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey MJ. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol* 2005; 174(2):589-94.

Pitchumoni CS, Patel NM, Shah P. Factors influencing mortality in acute pancreatitis: can we alter them? *J Clin Gastroenterol* 2005; 39(9): 798-814.

Ramudo L, Manso MA, Sevillano S, de Dios I. Kinetic study of TNF-alpha production and its regulatory mechanisms in acinar cells during acute pancreatitis induced by bile-pancreatic duct obstruction. *J Pathol* 2005; 206(1):9-16.

Ranson JH. Diagnostic Standards for Acute Pancreatitis. *World J Surg* 1997; 21:136-42.

Renner IG, Savage WT, Pantoja JL, Renner VJ. Death due to acute pancreatitis. A retrospective analyseis of 405 autopsy cases. *Dig Dis Sci* 1985; 30: 1005-18.

Rivera JA, Werner J, Warshaw AL, Lewandrowski KB, Rattner DW, Fernandez del Castillo C. Lexipafant fails to improve survival in severe necrotizing pancreatitis in rats. *Int J Pancreatol* 1998; 23(2):101-6.

Rizzo MT, Nguyen E, Aldo-Benson M, Lambeau G. Secreted phospholipase A₂ induces vascular endothelial cell migration. *Blood* 2000; 96(12):3809-15.

Rongione AJ, Kusske AM, Reber HA, Ashley SW, McFadden DW. Interleukin-10 reduces circulating levels of serum cytokines in experimental pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 1997; 1(2):159-66.

Saluja AK, Lee HS, Bhatia M, Frossard JL, Steer ML. Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury in rat pancreatic acini. *Am J Physiol* 1999; 276, G835-842.

Samuel I, Toriumi Y, Yokoo H, Wilcockson DP, Trout JJ, Joehl RJ. Ligation-induced acute pancreatitis in rats and opossums: a comparative study on the early phase. *J Surg Res* 1994; 57-299-311.

Sarles H. The exocrine pancreas. *Int Rev Physiol* 1977; 12:173-221.

Satoh A, Shimosegawa T, Satoh K, Ito H, Kohno Y, Masmune A, Fujita M, Toyota T. Activation of adenosine A₁-receptor pathway induces oedema formation in the pancreas of rats. *Gastroenterology* 2000; 119, 829-36.

Scarpelli DG. The pancreas. (2^d.) *JB Lippincott Company, Philadelphia* 1994; 777-794.

Schevitz RW, Bach NJ, Carlson DG, Chirgadze NY, Clawson DK, Dillard RD, Draheim SE, Hartley LW, Jones ND, Mihelich ED. Structure-based design of the first potent and selective inhibitor of human non-pancreatic secretory phospholipase A₂. *Nat Struct Biol Jun* 1995; 2(6):458-65.

Schmidt H, Creutzfeldt W. The possible role of phospholipase A₂ in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1969; 4:39-48.

Scholmerich J. Interleukins in acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996; 219, 37-42.

Schröder T, Kivilaakso E, Kinnunen PKJ, Lempinen M. Serum phospholipase A₂ in acute human pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15:633-6.

Senninger N, Moody FG, van Buren DH. Effect of biliary obstruction on pancreatic exocrine secretion in conscious opossums. *Surgical Forum* 1984; 35 ,226-228.

Sirois MG, Jancar S, Braquet P, Plant GE, Sirois P. PAF increases vascular permeability in selected tissues: effect of BN-52021 and L-655,240. *Prostaglandins* 1988; 36:631-44.

Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: Classification and characterization. *Biochem Biophys Acta* 2000; 1488:1-19.

Slogoff MI, Ethridge RT, Rajaraman S, Evers BM. COX-2 inhibition results in alterations in nuclear factor (NF)-kappaB activation but not cytokine production in acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2004; 8(4):511-9.

Smith ME, Morton DG, ed. Churchill Livingstone [on-line]. Birmingham, United King: 2001 June [acesso em 05 nov. 2006] Disponível em URL: <http://intl.elsevierhealth.com>

Snyder F. Biochemistry of platelet-activating factor: a unique class of biologically active phospholipids. *Proc Soc Exp Biol Med* 1989; 190(2):125-35.

Song AM, Bhagat L, Singh VP, Van Acker GG, Steer ML, Saluja AK. Inhibition of cyclooxygenase-2 ameliorates the severity of pancreatitis and associated lung injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283(5):G1166-74.

Steer ML. Early events in acute pancreatitis. *Baill Clin Gastroenterol* 1999; 13(2):213-25.

Storck G. Fat necrosis in acute pancreatitis. Morphological and chemical study in the rat. *Acta Chir Scand* 1971; 47:1-36.

Toyama MH, Mancuso LC, Giglio JR, Novello JC, Oliveira B, Marangoni S. A quick procedure for the isolation of dimeric piratoxins-I and II, two myotoxins from *Bothropos pirajai* snake venom. N-terminal sequencing. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 37, 1047-55.

Tsukahara Y, Morisaki T, Horita Y, Motomichi MD, Tanaka M. Phospholipase A₂ mediates nitric oxide production by alveolar macrophages and acute lung injury in pancreatitis. *Annals of Surgery* 1999; 229(3):385-92.

Uhl W, Schrag N, Schmitter N, Aufenanger J, Nevalainen TJ, Buchler MW. Experimental study of a novel phospholipase A₂ inhibitor in acute pancreatitis. *Br J Surg* 1998; 85, 618-23.

Um SH, Kwon YD, Kim CD, Lee HS, Jeon YT, Chun HJ, Lee SW, Choi JH, Ryu HS, Hyun JH. The role of nitric oxide in experimental cerulein induced pancreatitis. *J Korean Med Sci* 2003; 18(4):520-6.

Vadas P, Pruzanski W, Stefanski E. Characterization of extracellular phospholipase A₂ in human synovial fluid. *Life Sci* 1985; 36(6):579-87.

Van den Bergh CJ, Slotboom AJ, Verheij HM, de Haas GH. The role of Asp-49 and other conserved amino acids in phospholipases A₂ and their importance for enzymatic activity. *J Cell Biochem* 1989; 39(4), 379-90.

Vaquero E, Molero X, Puig-Divi V, Malagelada JR. Contrasting effects of circulating nitric oxide and nitrergic transmission on exocrine pancreatic secretion in rats. *Gut* 1998; 43(5):684-91.

Vishwanath BS, Kini RM, Gowda TV. Characterization of three edema-inducing phospholipase A₂ enzymes from habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid. *Toxicon* 1987; 25(5), 501-15.

Wang JP, Teng CM. Comparison of the enzymatic and edema-producing activities of two venom phospholipase A₂ enzymes. *Eur J Pharmacol* 1990; 190, 347-54.

Wasle B, Edwardson JM. The regulation of exocytosis in the pancreatic acinar cell. *Cell Signal* 2002; 14(3):191-7.

Werner J, Fernandez-del Castillo C, Rivera J, Kollias N, Rattner, DW, Warshaw AL. On the protective mechanisms of nitric oxide in acute pancreatitis. *Gut* 1998; 43:401-407.

Werner J, Rivera J, Fernandez-del Castillo C, Kollias N, Lewandrowski KB, Rattner DW, Warshaw AL. Different roles of nitric oxide in the patogenesis of acute edematous versus necrotizing pancreatitis. *Surgery* 1997; 121, 23-30.

Williams JA, Cary P, Moffat B. Effects of ions on amylase release by dissociated pancreatic acinar cells. *Am J Physiol* 1976; 231(5):1562-7.

Williams JA, Korc M, Dormer RL. Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini. *Am J Physiol* 1978; 235(5):517-24.

Williams JA. Intracellular signaling mechanisms activated by cholecystokinin-regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells. *Annu Rev Physiol* 2001; 63:77-97.

Wilson PG, Manji M, Neoptolemos JP. Acute pancreatitis as a model of sepsis. *J Antmicr Chemother* 1998; 41, 51-63.

Yadav D, Agarwal N, Pitchumoni CS. A critical evaluation of laboratory tests in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2002; 97 (6):1309-18.

Yadav D, Lowenfels AB. Trends in the epidemiology of the first attack of acute pancreatitis: a systematic review. *Pancreas* 2006; 33(4):323-30.

Yee SB, Ganey PE, Roth RA. The role Kupffer cells and TNF- α in monocrotaline and bacterial lipopolysaccharide-induced liver injury. *Toxic Science* 2002; 71:124-32.

Yoshikawa T, Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Nakae Y, Ono T, Hayakama T. Effect of a new inhibitor of type II phospholipase A₂ on experimental acute pancreatitis in rats. *Pancreas* 1999; 19(2):193-8.

Zuliani JP, Fernandes CM, Zamuner SR, Gutiérrez JM, Teixeira CFP. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. *Toxicon* 2005; 45(3):335-46.

ANEXO I



Toxicon 46 (2005) 921–926

TOXICON

www.elsevier.com/locate/toxicon

Characterization of the acute pancreatitis induced by secretory phospholipases A₂ in rats

Enilton A. Camargo^a, Laura C.M. Esquisatto^b, Marcelo A. Esquisatto^b,
Maria Teresa C.P. Ribela^c, Adélia C. Cintra^d, José R. Giglio^d,
Edson Antunes^a, Elen C.T. Landucci^{a,e,*}

^a Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP),
P.O. Box 6111, 13084-971 Campinas, SP, Brazil

^b University Center Hermínio Otonari, Araras, SP, Brazil

^c Biotechnology Department of IPEN/CNEN, São Paulo, SP, Brazil

^d Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto (SP), University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^e Department of Biochemistry, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6111, 13084-971 Campinas, SP, Brazil

Received 6 June 2005; revised 20 September 2005; accepted 21 September 2005

Available online 2 November 2005

Abstract

Acute pancreatitis (AP) is an inflammatory disease of the pancreas characterized by local inflammation and extrapancreatic effects such as lung injury. Secretory phospholipases A₂ (sPLA₂s) have been implicated in triggering AP, but their exact role to evoke AP is largely unknown. Therefore, we have tested the ability of sPLA₂s to induce AP in rats, using venom sPLA₂s with residual or high enzymatic activity (bothropstoxin-II and *Naja m. mocambique* venom PLA₂, respectively), as well as sPLA₂ devoid of catalytic activity (piratoxin-I). The injection of *Naja m. mocambique* venom PLA₂, bothropstoxin-II or piratoxin-I (300 µg/kg each) into the common bile duct increased significantly the pancreatic plasma extravasation and myeloperoxidase activity. The lung myeloperoxidase and serum amylase were also increased for all groups, although the *Naja mocambique* venom PLA₂ induced higher lung myeloperoxidase and serum amylase values, compared with piratoxin-I and/or bothropstoxin-II. Histopathology of pancreas and lungs in piratoxin-I-injected rats showed interstitial oedema in both tissues, and neutrophil infiltration with acinar cell necrosis in pancreas. In conclusion, sPLA₂s induce AP in rats and the catalytic activity is not essential to induce the local effects in pancreas, although it appears to contribute partly to the remote lung injury.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Phospholipases A₂; Acute pancreatitis; Catalytic activity; Sodium taurocholate

1. Introduction

Acute pancreatitis is a disease characterized by premature activation of pancreatic enzymes, causing a local inflammatory reaction that can progress to a systemic

response and subsequent multiorgan failure (Bhatia, 2002). The severity of acute pancreatitis ranges from mild, self-limited type of edematous pancreatitis to severe necrotizing form. In the most severe forms of the disease, the pancreatic and extrapancreatic tissue damage cause high mortality, mainly due to the impairment of the lung function, which closely resembles the adult respiratory distress syndrome associated with other process such as shock and ischemia/reperfusion (Steer, 2001). The mechanisms underlying the

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3788 9558; fax: +55 19 3289 2968.

E-mail address: elanducci@terra.com.br (E.C.T. Landucci).

lung injury induced by acute pancreatitis are not clearly understood, but it is known that activated enzymes and diverse proinflammatory mediators generated in the pancreas and activated leukocytes contribute to the lung complications (Bhatia et al., 2000; Pastor et al., 2003).

Phospholipases A₂ (PLA₂s) are enzymes that catalyses the hydrolysis of the cell membrane phospholipids, generating arachidonic acid, which is the common precursor for the formation of arachidonic acid metabolites and the platelet-activating factor (PAF). Generally, the PLA₂s can be divided into cytosolic Ca²⁺-dependent PLA₂ (cPLA₂), intracellular Ca²⁺-independent PLA₂ (iPLA₂) and secretory (sPLA₂) enzymes. The cPLA₂s are high molecular mass (85 kDa) enzymes found in the cytosolic fraction of nearly all cell types, and are able to translocate to membranes in response to increases in intracellular Ca²⁺. The iPLA₂s are also intracellular, present high molecular mass and show absence of Ca²⁺ requirement for their catalytic activity. The sPLA₂s are low molecular mass (14 kDa) extracellular enzymes that have many sources, such as snake venoms, mammalian pancreatic juice and synovial fluid (Dennis, 1994; Balsinde et al., 1999). An interesting subgroup of venom PLA₂s includes homologue enzymes presenting variable catalytic activity due to the critical amino acid substitutions at the calcium-binding loop. The Asp-49 PLA₂s present variable enzymatic activity; however, when the aspartate is substituted by lysine at the position 49, the resulting Lys-49 PLA₂s show a lack of catalytic activity. These PLA₂s can be found in various snake venoms, mainly in the *Bothrops* genus (Van den Bergh et al., 1989; Gutiérrez and Lomonte, 1995). A considerable number of works have reported an important role for PLA₂s in triggering various inflammatory diseases, including acute pancreatitis (Buchler et al., 1989a; Nevalainen, 1993; Uhl et al., 1997; Makela et al., 1999). Increased serum catalytic PLA₂ activity has been implicated in the pathogenesis of remote organ failure such as the pulmonary insufficiency arising from necrotizing acute pancreatitis (Buchler et al., 1989b).

Some experimental models have been developed to study acute pancreatitis in laboratory animals, such as the retrograde injection of biliary salts, bile or activated enzymes into the common bile duct (Aho et al., 1980; Steer, 1999). However, no study has attempted to investigate whether PLA₂s itself are able to trigger acute pancreatitis in the rat. Therefore, we have used the pancreatic duct injection of different PLA₂s as a model of induction of pancreatitis in rats, analyzing the pancreatic and lung myeloperoxidase activity (as a marker of neutrophil influx), pancreatic plasma extravasation, serum amylase levels determination, and the histopathology of pancreas and lungs. To achieve this, the sPLA₂ homologues bothropstoxin-II, piratoxin-I and *Naja mocambique mocambique* venom PLA₂ were used. Bothropstoxin-II is an Asp-49 PLA₂ isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom, which contains residual enzymatic activity (Homs-Brandenburg et al., 1988; Pereira et al., 1998), whereas Piratoxin-I

is a Lys-49 PLA₂ isolated from *Bothrops pirajai* snake venom, which is completely devoid of enzymatic activity (Mancuso et al., 1995; Holzer and Mackessy, 1996). In contrast, the PLA₂ isolated from *Naja mocambique mocambique* venom present high catalytic activity.

2. Experimental procedures

2.1. Materials and drugs

Bothropstoxin-II and piratoxin-I were isolated and purified according to previous studies (Homs-Brandenburg et al., 1988; Mancuso et al., 1995). *Naja mocambique mocambique* venom PLA₂, sodium taurocholate (taurocholic acid and sodium salt), hexadecyltrimethylammonium bromide and α -dianisidine dihydrochloride were obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Hydrogen peroxide, paraformaldehyde and ParaplastTM resin were obtained from Merck SA (Rio de Janeiro, Brazil). ¹²⁵I-Human serum albumin was radio-labelled in the Biotechnology Department at Biological Sciences of University of São Paulo (IPEN/CENEN-USP, São Paulo, Brazil).

2.2. Acute pancreatitis induction

Experiments were performed in male Wistar rats (220–250 g). All experiments were carried out in accordance with the guidelines for animal care of the State University of Campinas (UNICAMP). The animals were anaesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg) and a medium laparotomy was performed. The common bile duct was cannulated transduodenally with a polyethylene tube according to the method described by Storck (1971). Saline (0.9%), *Naja mocambique mocambique* venom PLA₂, bothropstoxin-II or piratoxin-I (300 µg/kg, each) were injected into the duct in a final volume of 0.3 ml, with a constant flow over a 1-min period. The bile salt sodium taurocholate (5%, 0.3 ml) was also injected into the duct as a positive control. The hepatic portion of the common bile duct was clipped before injecting the solutions. After the procedure, the abdomen was closed in two layers, and the animals were allowed to recover from anaesthesia. After selected time post-injection, the animals were sacrificed and the pancreas, lung and blood samples were collected.

2.3. Pancreatic plasma extravasation

Pancreatic plasma protein extravasation was measured by the accumulation of intravenously injected ¹²⁵I-human serum albumin (2.5 µCi/rat). A blood sample was collected, centrifuged at 8000 g for 10 min to obtain a plasma sample. The pancreas and plasma samples were counted for radioactivity (γ-counter). Plasma extravasation was expressed as the volume (µl) of plasma accumulated at

each pancreas compared to total counts in 1 ml of plasma (Brain and Williams, 1985).

2.4. Pancreatic and lung myeloperoxidase activity

The pancreas and lung were collected and placed in a test tube in the presence of 0.5% of hexadecyltrimethylammonium bromide in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.0. Each tissue sample was homogenized and 1-ml aliquots of the homogenate were decanted into Eppendorf tubes. These tubes were then centrifuged at 14,000 rpm for 2 min, and the supernatants were collected. A myeloperoxidase assay was performed using a microtiter plate scanner (Spectra Max 34, Molecular Devices, USA). This consisted of mixing 5 μ l of sample with 200 μ l of α -diaminidine solution (0.167 mg/ml of α -diaminidine dihydrochloride and 0.0005% hydrogen peroxide) prior to reading the plate. The changes in absorbance were measured at 460 nm for 15 s over a period of 5 min. The myeloperoxidase activity was expressed as myeloperoxidase units/mg of tissue. One unit of myeloperoxidase activity was defined as that degrading 1 μ mol of peroxide/min at 25 °C (Bradley et al., 1982).

2.5. Serum α -amylase levels determination

The serum α -amylase levels were measured using a commercial kit (LaborLab, São Paulo, Brazil). The values were expressed as units of enzyme (U)/l. This method is based in the hydrolysis of the synthetic specific substrate (2-chloro-4-phenyl-galactate piranosil maltodextrin) by the α -amylase, generating the chloranilphenol, which absorbance is detected at 405 nm.

2.6. Histopathology of pancreas and lungs

The animals were submitted to injection of saline or piratoxin-I (300 μ g/kg) were anesthetized and exsanguinated from the abdominal aorta. The pancreas and lung were collected, fixed by immersion in Millonig buffer content 4% paraformaldehyde and processed to embed in Paraplast™ resin. Sections of 5 μ m were obtained and stained by hematoxylin-eosin (HE) and Toluidine blue methods. The tissues were evaluated for the tissue necrosis, parenchyma abscess, leukocyte infiltration and interstitial oedema.

2.7. Statistical analysis

Results were expressed as mean values $\pm$ SEM for n animals. The values were analysed by Student's unpaired t -test or analysis of variance (ANOVA) for multiple comparisons followed by Bonferroni's modified t -test. $P < 0.05$ was taken as significant.

3. Results

3.1. Local pancreatic inflammatory reaction induced by sPLA₂

The injection of *Naja m. mocambique* venom PLA₂, bothropstoxin-II or piratoxin-I (300 μ g/kg each, 0.3 ml) into the common bile duct increased the pancreatic plasma extravasation, in comparison with the saline group, as observed at 4 h after duct injection (Fig. 1(A)). Injection of 0.3 ml of sodium taurocholate solution (5%) into the pancreatic duct also caused a significant increase in pancreatic plasma extravasation (Fig. 1(A)). No statistical differences among all tested groups were found. The injection of *Naja m. mocambique* venom PLA₂, bothropstoxin-II, piratoxin-I (300 μ g/kg each, 0.3 ml) and sodium taurocholate (0.3 ml of a 5% solution) also markedly increased neutrophil sequestration to the pancreas, compared with saline group (Fig. 1(B)). No statistical differences among all tested groups were found.

3.2. Remote lung inflammatory reaction induced by sPLA₂

To investigate whether a local inflammation by sPLA₂s could lead to a remote lung injury, we evaluated the myeloperoxidase activity in the lung tissues. The injection of piratoxin-I, bothropstoxin-II and *Naja m. mocambique* venom PLA₂ (300 μ g/kg each) enhanced significantly the myeloperoxidase activity, but the increases induced by bothropstoxin-II and *Naja m. mocambique* venom PLA₂ were higher ($P < 0.05$) compared with piratoxin-I. The increased lung myeloperoxidase activity induced by sodium taurocholate was significantly higher than the sPLA₂s (Fig. 1(C)).

3.3. Effect of sPLA₂s on the serum amylase levels

Fig. 1(D) shows that injection of *Naja m. mocambique* PLA₂, bothropstoxin-II or piratoxin-I (300 μ g/kg each, 0.3 ml) into the common bile duct significantly increased the serum amylase levels in comparison with the saline group. The increases induced by *Naja m. mocambique* venom PLA₂ were higher ($P < 0.05$) compared with piratoxin-I or bothropstoxin-II. The increased serum amylase levels in response to sodium taurocholate were significantly higher than the all sPLA₂s tested.

3.4. Time course of piratoxin-I-induced pancreatitis

We have further evaluated the time-course of piratoxin-I (300 μ g/kg)-induced pancreatitis. The higher pancreatic plasma extravasation was observed at 4 h after the induction, decreasing at 8 and 12 h, but still significant compared with the saline group ($n = 5$; Table 1). The basal

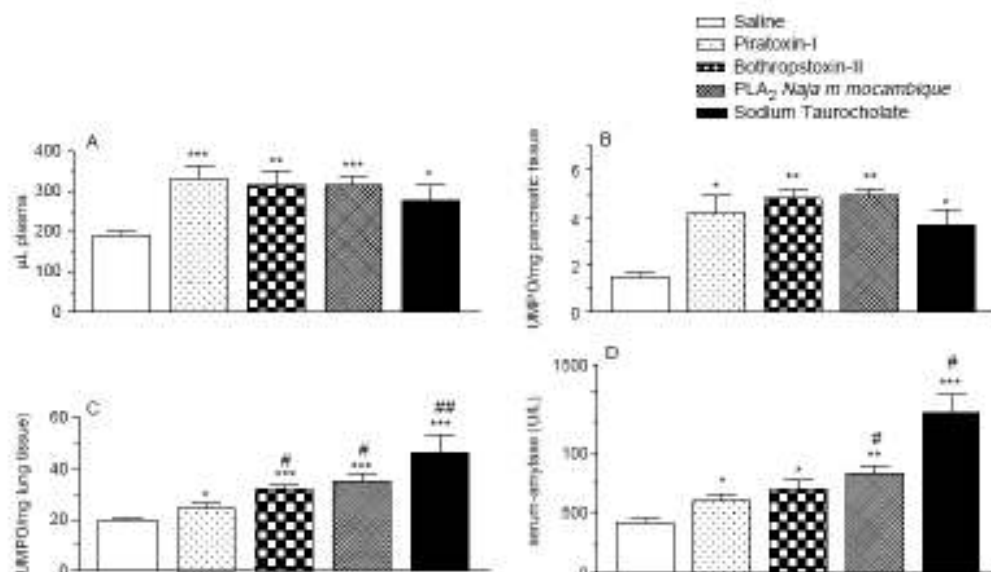


Fig. 1. Acute pancreatitis induced by injection of secretory phospholipases A_2 into the common bile duct of rats. Saline (vehicle), piratoxin-I (300 $\mu\text{g/kg}$), bothropstoxin-II (300 $\mu\text{g/kg}$), *Naja m. mocambique* venom PLA_2 (300 $\mu\text{g/kg}$), or sodium taurocholate (5%) were injected into the common bile duct in a final volume of 0.3 ml. Pancreatic plasma extravasation (A), pancreatic myeloperoxidase activity (B), lung myeloperoxidase activity (C) and serum amylase (D) were measured 4 h after duct injection. Each column represents the mean $\pm$ SEM of 6–8 rats. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to saline group. # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ compared to piratoxin-I group.

values for the pancreatic plasma extravasation were reached at 48 and 96 h. The lung myeloperoxidase activity showed significant increases at 4 and 8 h after the induction, returning to basal values at 12–96 h post-induction. The amylase levels also peaked at 4 h, decreasing significantly thereafter (Table 1).

3.5. Histological analysis of piratoxin-I-induced pancreatitis

Histological examination of the lungs from control rats (injected intraductally with saline) showed normal tissue

($n = 3$). The histological analysis of the lungs of animals submitted to the intraductal injection of piratoxin-I (300 $\mu\text{g/kg}$; $n = 3$) showed areas of interstitial oedema with concomitant diminution of the alveolar space, as observed from 4 to 96 h after the pancreatitis induction, which peaked at 8–12 h. In the pancreatic tissue, neutrophil infiltration with areas of acinar cell necrosis and interstitial edema was seen at 4 h, peaking at 12 h post-piratoxin-I injection. After 48 and 96 h, pancreatic parenchyma regeneration was observed. Thus, the acinar cell necrosis, the increased vascular permeability and the inflammatory cells infiltration probably represent early events in the pancreatic tissue damage.

Table 1

Time course of rat pancreatitis induced by piratoxin-I (PRTX)

	Group	Time after induction					
		4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	96 h
Pancreatic plasma extravasation ($\mu\text{l plasma}$)	Saline	189 $\pm$ 9	217 $\pm$ 13	204 $\pm$ 7	132 $\pm$ 12	92 $\pm$ 7	90 $\pm$ 4
	PRTX	332 $\pm$ 34*	273 $\pm$ 24*	264 $\pm$ 6*	154 $\pm$ 8	98 $\pm$ 3	96 $\pm$ 3
Lung MPO activity (UMPO/mg tissue)	Saline	20 $\pm$ 1	19 $\pm$ 1	15 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2	15 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1
	PRTX	26 $\pm$ 2*	23 $\pm$ 1*	17 $\pm$ 2	13 $\pm$ 2	16 $\pm$ 1.5	12 $\pm$ 2
Serum amylase levels (U/L)	Saline	422 $\pm$ 31	521 $\pm$ 49	428 $\pm$ 80	346 $\pm$ 21	164 $\pm$ 6	174 $\pm$ 24
	PRTX	607 $\pm$ 43*	649 $\pm$ 78	434 $\pm$ 29	342 $\pm$ 21	201 $\pm$ 4	188 $\pm$ 7

Different groups of animals were killed at the indicated time after the injection of sterile saline or piratoxin-I (300 $\mu\text{g/kg}$) into the common bile duct. Measurement of pancreatic plasma extravasation ($\mu\text{l plasma}$), lung myeloperoxidase activity (MPO; UMPO/mg tissue) and serum amylase (U/L) were performed. Each value represents the mean values $\pm$ SEM of five rats; * $P < 0.05$ compared to the respective saline group.

4. Discussion

In the present study, we have showed that common bile duct injection of *Naja m. mocambique* venom PLA₂, bothropstoxin-II and piratoxin-I significantly increase the vascular permeability and neutrophil influx in the pancreas, which is accompanied by elevated serum amylase levels and neutrophil accumulation into the lungs. The histopathological study in the pancreatic tissue confirmed the presence of neutrophil infiltration with areas of acinar cell necrosis and interstitial edema, which are signs of early events in the pancreatic tissue damage.

Previous studies have demonstrated that snake venom PLA₂s evoke local inflammatory effects characterized by increases in vascular permeability and oedema formation, leukocyte recruitment into tissues and release of inflammatory mediators, that take place by mechanisms dependent (Cirino et al., 1989; Moreno et al., 1992; Lloret and Moreno, 1993) or independent of their catalytic activity (Landucci et al., 1998; 2000; Castro et al., 2000; see also Teixeira et al., 2003 for review). In our present study, the local inflammatory reactions in the pancreas (oedema and neutrophil influx) were of the same magnitude for piratoxin-I (Lys-49 PLA₂ devoid of catalytic activity), bothropstoxin-II (Asp-49 PLA₂ with small catalytic activity) and *Naja mocambique* venom PLA₂ (enzyme with high catalytic activity), indicating that catalytic activity does not play a role in triggering such local pancreatic effects. On the other hand, both the neutrophil influx into the lung tissue and serum amylase levels were higher for bothropstoxin-II and *Naja mocambique* venom PLA₂ in comparison with piratoxin-I, suggesting that remote pulmonary inflammation depends, at least partly, on their catalytic activity. Considering that bothropstoxin-II evokes pulmonary neutrophil accumulation at the same extent as *Naja mocambique* venom PLA₂, it is likely that a low catalytic activity is already sufficient to trigger the remote lung inflammation. Additionally, *Naja mocambique* venom PLA₂ induced higher serum amylase levels than piratoxin-I, further suggesting that catalytic activity of sPLA₂ may play a role in initiating the systemic and remote inflammation in response to a local pancreatic lesion. Interestingly, interactions of snake venom sPLA₂s with membrane glycosaminoglycans in neutrophil membranes have been shown to trigger a cascade of biochemical events consisting of activation of G-protein, PKC and intracellular Ca²⁺-independent PLA₂, the latter of which is supposed to regulate the release of arachidonic acid and hence the generation of the lipid chemoattractants leukotriene B₄ and PAF, leading in turn to neutrophil activation and locomotion (Gambero et al., 2002; 2004).

Sodium taurocholate was first described to induce haemorrhagic necrotizing pancreatitis in rats (Aho et al., 1980). Several works have demonstrated that in pancreatitis

induced by sodium taurocholate, the lung myeloperoxidase, serum amylase and other inflammatory mediators are markedly increased (Marton et al., 1998; Vaquero et al., 2001; Cosen-Binker et al., 2003; Pereda et al., 2004). Accordingly, in our study, sodium taurocholate increased the pancreatic protein plasma extravasation and neutrophil influx in a similar extent to the three PLA₂ homologues used, but the effects on lung neutrophil influx and serum amylase levels were markedly higher than those of the PLA₂s. Interestingly, the pancreatitis induced by sodium taurocholate has recently been shown to involve the activation of an endogenous sPLA₂ since a selective inhibitor of sPLA₂ (S-5920 LY315920Na) strongly reduced the mortality, the pancreas tissue damage, and the blood biochemical changes, including amylase levels (Tomita et al., 2004).

In our study, time-course experiments were performed with piratoxin-I. For this purpose, the animals were sacrificed at 4, 8, 12, 48 and 96 h after the induction of pancreatitis. The higher differences between piratoxin-I and saline groups were observed at 4 h after the intraductal injection of piratoxin-I, the time by which myeloperoxidase activity, plasma extravasation and serum amylase levels are higher. At 4 h, the histological analysis of piratoxin-I-injected rats showed acinar cell necrosis, oedema formation and cell infiltration, strongly suggesting that they are early events in the pancreatic tissue damage.

In summary, our study demonstrated that the injection of sPLA₂s into the common bile duct causes acute pancreatitis in rats. We also showed that the catalytic activity is not essential for inducing the local effects in the pancreas, although it appears to contribute at least in part to the remote lung neutrophil accumulation observed during this process. We also suggest that the common bile duct injection of PLA₂s consist of a useful experimental model to reproduce some of the changes observed in the human pancreatitis, representing a new perspective to study the role of PLA₂ in acute pancreatitis.

Acknowledgement

E. A. Camargo is supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

References

- Aho, H.J., Koskensalo, S.M.L., Nevalainen, T.J., 1980. Experimental pancreatitis in the rat. *Scand. J. Gastroent.* 15, 411–416.
- Balazs, J., Balboa, M.A., Insel, P.A., Dennis, E.A., 1999. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 175–189.
- Bhatia, M., 2002. Novel therapeutic targets for acute pancreatitis and associated multiple organ dysfunction syndrome. *Curr. Drug Target. Inflamm. Allergy* 1, 343–351.

- Bhatia, M., Brady, M., Shokuhl, S., Christmas, S., Neoptolemos, J.P., Slavin, J., 2000. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J. Pathol.* 190, 117–123.
- Bradley, P.P., Priebe, M.D., Christensen, M.D., Rothstein, G., 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.* 78, 206–209.
- Brain, S.D., Williams, T.J., 1985. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br. J. Pharmacol.* 86, 855–860.
- Buchler, M., Deller, A., Malfertheiner, P., Kleine, H.O., Wiedeck, H., Uhl, W., Santner, M., Friess, H., Nevalainen, T., Beger, H.G., 1989a. Serum phospholipase A₂ in intensive care patients with peritonitis, multiple injury and necrotizing pancreatitis. *Klin. Wochenschr.* 67, 217–221.
- Buchler, M., Malfertheiner, P., Shoodlich, H., Nevalainen, T.J., Friess, H., Beger, H.G., 1989b. Role of phospholipase A₂ in human acute pancreatitis. *Gastroenterology* 97, 1521–1526.
- Castro, R.C., Landucci, E.C.T., Toyama, M.H., Giglio, J.R., Marangoni, S., De Nucci, G., Antunes, E., 2000. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A₂ into the rat pleural cavity. *Toxicon* 38, 1773–1785.
- Cirino, G., Peers, S.H., Wallace, J.L., Flower, R.J., 1989. A study of phospholipase A₂-induced oedema in rat paw. *Eur. J. Pharmacol.* 166, 505–510.
- Crosen-Binker, L.I., Binker, M.G., Negri, G., Tiscornia, O., 2003. Experimental model of acute pancreatitis in Wistar rat. Glucocorticoid treatment profile. *Dig. Dis. Sci.* 48, 1453–1464.
- Dennis, E.A., 1994. Diversity of group type, regulation, and function of phospholipases A₂. *J. Biol. Chem.* 269, 13057–13060.
- Ganhem, A., Landucci, E.C.T., Toyama, M.H., Marangoni, S., Giglio, J.R., Nader, H.B., Dietrich, C.P., De Nucci, G., Antunes, E., 2002. Human neutrophil migration in vitro induced by secretory phospholipases A₂: a role for cell surface glycosaminoglycans. *Biochem. Pharmacol.* 63, 65–72.
- Ganhem, A., Thomazzi, S.M., Cintra, A.C.O., Landucci, E.C.T., De Nucci, G., Antunes, E., 2004. Signalling pathways regulating human neutrophil migration induced by secretory phospholipases A₂. *Toxicon* 44, 473–481.
- Galán, J.M., Lomonte, B., 1995. Phospholipase A₂ myotoxins from Bothrops snake venom. *Toxicon* 33, 1405–1424.
- Holzer, M., Mockesay, S.P., 1996. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. *Toxicon* 34, 1149–1155.
- Honni-Brandebrun, M.L., Queiroz, L.S., Santo-Neto, H., Rodrigues-Simioni, L., Giglio, J.R., 1988. Fractionation of Bothrops jararacussu snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon* 26, 615–627.
- Landucci, E.C.T., Pereira, M.F., Cintra, A.C.O., Giglio, J.R., Marangoni, S., Oliveira, B., Cirino, G., Antunes, E., De Nucci, G., 1998. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. *Eur. J. Pharmacol.* 343, 257–265.
- Landucci, E.C.T., de Castro, R.C., Toyama, M., Giglio, J.R., Marangoni, S., De Nucci, G., Antunes, E., 2000. Inflammatory oedema induced by the lys-49 phospholipase A₂ homologue pirotoxin-I in the rat and rabbit. Effect of polyanions and *p*-bromophenacyl bromide. *Biochem. Pharmacol.* 59, 1289–1294.
- Lloret, S., Moreno, J.J., 1993. Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A₂ purified from porcine pancreas and snake venoms. *Toxicon* 31, 949–956.
- Makela, A., Kausi, T., Nuntinen, P., Schroder, T., 1999. Phospholipase A₂ activity in body fluids and pancreatic tissue in patients with acute necrotizing pancreatitis. *Eur. J. Surg.* 165, 35–42.
- Mancuso, L.C., Correa, M.M., Vieira, C.A., Cunha, O.A.B., Lachor, J.J., Seliste, H.S.A., Why, C.L., Giglio, J.R., 1995. Fractionation of Bothrops pinjai snake venom: isolation and characterization of pirotoxin-I, a new myotoxic protein. *Toxicon* 33, 615–626.
- Morton, J., Farkas, G., Takacs, T., Nagy, Z., Szasz, Z., Varga, J., Jarmay, K., Balogh, A., Lonovics, J., 1998. Beneficial effects of pentoxifylline treatment of experimental acute pancreatitis in rats. *Res. Exp. Med.* 197, 293–299.
- Moreno, J.J., Ferrer, X., Ortega, E., Carganico, G., 1992. PLA₂-induced oedema in rat skin and histamine release in rat mast cells. Evidence for involvement of lysophospholipids in the mechanism of action. *Agents Actions* 36, 258–265.
- Nevalainen, T.J., 1993. Serum phospholipase A₂ in inflammation diseases. *Clin. Chem.* 39, 2453–2459.
- Pareda, J., Salazar, L., Casanillo, N., Gómez-Cambronero, L., Ciosa, D., Foch-Puy, E., Aparisi, L., Calveti, J., Cerd  , M., L  d  , S., Viña, J., Sastre, J., 2004. Effect of simultaneous inhibition of TNF-production and xanthine oxidase in experimental acute pancreatitis. The role of mitogen activated protein kinases. *Ann. Surg.* 108, 116.
- Pereira, M.F., Novello, J.C., Cintra, A.C., Giglio, J.R., Landucci, E.C.T., Oliveira, B., Marangoni, S., 1998. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from Bothrops jararacussu (Jararacussu) venom with low phospholipase A₂ activity. *J. Protein. Chem.* 17, 381–386.
- Steer, M.L., 1999. Early events in acute pancreatitis. *Baill. Clin. Gastroenterol.* 213–225.
- Steer, M.L., 2001. Relationship between pancreatitis and lung diseases. *Respir. Physiol.* 128, 13–16.
- Storck, G., 1971. Fat necrosis in acute pancreatitis. Morphological and chemical study in the rat. *Acta Chir. Scand.* 47, 1–36.
- Teixeira, C.F., Landucci, E.C., Antunes, E., Chacur, M., Cury, Y., 2003. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. *Toxicon* 42, 947–962.
- Tomita, Y., Kawabara, K., Furue, S., Tanaka, K., Yamada, K., Ueno, M., Ono, T., Maruyama, T., Ajiki, T., Onoyama, H., Yamamoto, M., Hon, Y., 2004. Effect of a selective inhibitor of secretory phospholipase A₂, S-990LY315920Na, on experimental acute pancreatitis in rats. *J. Pharmacol. Sci.* 96, 144–154.
- Uhl, W., Schrag, H.J., Schmitter, N., Nevalainen, T.J., Aufferinger, J., Wheatley, A.M., Buchler, M.W., 1997. Pathophysiological role of secretory type I and II phospholipase A₂ in acute pancreatitis: an experimental study in rats. *Gut* 40, 386–402.
- Van den Bergh, C.J., Slothboom, A.J., Verheij, H.M., de Haas, G.H., 1989. The role of Asp-49 and other conserved amino acids in phospholipases A₂ and their importance for enzymatic activity. *J. Cell. Biochem.* 39, 379–390.
- Vaquero, E., Gukovsky, I., Ziminovic, V., Gukovskaya, A.S., Pandolf, S.J., 2001. Localized pancreatic NF-  B activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280, G1197–G1208.

ANEXO II

Role of substance P and bradykinin in acute pancreatitis induced by secretory phospholipase A₂

Enilton A. Camargo^{a*} PhD, Tatiane Ferreira^a MSci, Maria Teresa C.P. Ribela^b PhD,
Gilberto de Nucci^a, MD, PhD, Elen C.T. Landucci^{a,c} PhD, Edson Antunes^a PhD

^aDepartment of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas (SP), Brazil

^b Biotechnology Department, IPEN/CNEN, São Paulo (SP), Brazil

^cDepartment of Biochemistry, Institute of Biology, UNICAMP, Campinas (SP), Brazil

Running Title: Substance P and bradykinin during sPLA₂-induced pancreatitis

Financial support: Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

***Corresponding author:**

Edson Antunes

Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, PO Box 6111,
Postal Code 13084-971, Campinas (SP), Brazil

Tel.: +55-19-3521-9556; Fax: +55-19-3289-2968

E-mail address: edson.antunes@uol.com.br; antunes@fcm.unicamp.br

Abstract

Objectives: Secretory phospholipases A₂ (sPLA₂s) induce acute pancreatitis when injected into the common bile duct of rats. Substance P via NK-1 receptors and bradykinin via B₂ receptors are described to play important roles in the pathophysiology of acute pancreatitis. This study was undertaken to evaluate the role of substance P and bradykinin in the sPLA₂-induced pancreatitis.

Methods: Rats were submitted to the common bile duct injection of sPLA₂ obtained from *Naja mocambique mocambique* venom at 300 µg/kg. At 4 h thereafter, measurement of pancreatic plasma extravasation, pancreatic and lung myeloperoxidase, serum amylase and serum tumor necrosis factor-α (TNF-α) levels were evaluated.

Results: Injection of sPLA₂ significantly increased all parameters evaluated. Pretreatment with either the NK-1 receptor antagonist SR140333 or the B₂ receptor antagonist icatibant largely reduced the increased pancreatic plasma extravasation and circulating levels of TNF-α. Both treatments partly reduced the myeloperoxidase levels in pancreas, whereas in the lungs, icatibant was more efficient to reduce the increased myeloperoxidase levels. In addition, icatibant largely reduced the serum levels of amylase, whereas SR140333 had no significant effect.

Conclusions: We concluded that NK-1 and B₂ receptors can regulate important steps in the local and remote inflammation during the acute pancreatitis induced by sPLA₂.

Keywords: Acute pancreatitis; Bradykinin-2 receptor; Phospholipases A₂; Neurokinin-1 receptor

Introduction

Acute pancreatitis is a self limited inflammation of the pancreas that frequently spreads out to a systemic inflammatory condition leading to multiple organ failure, where the main remote organ affected is the lung (1). The severity in acute pancreatitis can range from mild pancreatitis, where the mortality is lesser than 5%, to the severe form, with a mortality rate that can reach 25% of the patients (2). A number of inflammatory mediators seem to take part in the complex pathophysiology of acute pancreatitis and consequent lung injury, but substance P acting via tachykinin NK-1 receptors, and bradykinin acting via B₂ receptors are reported to play important roles (3,4).

Phospholipases A₂ (PLA₂) are found in a variety of sources such as mammalian cells and venoms. They catalyze the hydrolysis of membrane phospholipids leading to the formation of proinflammatory mediators such as prostaglandins, prostacyclin, thromboxane A₂, leukotrienes and platelet activating factor (5). Phospholipases A₂ comprise three broad classes divided into cytosolic Ca²⁺-dependent (cPLA₂), intracellular Ca²⁺-independent (iPLA₂) and secretory enzymes (sPLA₂). The cPLA₂s and iPLA₂s are intracellular high molecular mass enzymes (31-110 kDa) found in different cell types, the former of which is able to translocate to membranes in response to increases in intracellular Ca²⁺, whereas the latter show absence of Ca²⁺ requirement for its catalytic activity. On the other hand, the sPLA₂s are low molecular mass (14 kDa) extracellular enzymes that have many sources, such as snake venoms, mammalian pancreatic juice and synovial fluid (6,7).

In patients with necrotizing acute pancreatitis, previous studies showed that the pathogenesis of remote organ failure, mainly pulmonary insufficiency and renal failure, was correlated with increased serum catalytic PLA₂ activity that is higher than in mild edematous pancreatitis (8-11). There is also accumulating evidence of the involvement of PLA₂ in acute pancreatitis (8,12,13). Recently, injection of different snake venom sPLA₂ into the biliopancreatic duct was reported to trigger acute pancreatitis in rats, as detected at 4 h and peaking at 12 h post-sPLA₂ injection (14). Interstitial edema, plasma extravasation, and neutrophil infiltration with areas of acinar cell necrosis were observed, together with elevated serum amylase levels. In the lung tissue, the histological analysis showed areas of interstitial oedema with concomitant diminution of the alveolar space, as observed up to 96

h after the pancreatitis induction. Since no study has been carried out to elucidate the mechanisms involved in sPLA₂-induced pancreatitis and that may be of great clinical importance, the present study was undertaken to further explore the inflammatory mediators involved in the local and remote inflammation during sPLA₂-induced pancreatitis, focusing our attention to the contribution of substance P and bradykinin to this disorder.

Materials and methods

Materials and drugs

Naja mocambique mocambique venom PLA₂, hexadecyltrimethylammonium bromide and *o*-dianisidine dihydrochloride were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Hydrogen peroxide was obtained from Merck SA (Rio de Janeiro, Brazil). ¹²⁵I-Human serum albumin was radio-labelled in the Biotechnology Department at IPEN/CNEN (University of São Paulo, São Paulo, Brazil). Icatibant (JE049) was obtained from Aventis Pharma Deutschland (Frankfurt, Germany). SR140333 ((S)-1-{2-(3-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-iso-propoxyphenylacetyl) piperidine-3-yl)ethyl}-4-phenyl-1-azoniabicyclol (2.2.2) octone chloride) was provided by Sanofi Recherche (Montpellier, France).

Drug treatment

Rats were pretreated with either the NK₁ receptor antagonist SR140333 (120 nmol/kg), given both i.v. 15 min before and s.c. after the pancreatitis induction or the bradykinin B₂ receptor antagonist icatibant (100 nmol/kg), given s.c. 30 min before and 1 h after the pancreatitis induction. These doses and treatment schedules have been chosen according to previous studies (15-17).

Acute pancreatitis induction

Experiments were performed in male Wistar rats (220–250 g). All experiments were carried out in accordance with the guidelines for animal care of the State University of Campinas (UNICAMP). The animals were anaesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg) and a medium laparotomy was performed. The biliopancreatic duct was cannulated transduodenally with a polyethylene tube according to the method described by Stork (18). Saline (0.9%) or sPLA₂ (obtained from *Naja mocambique mocambique* venom; 300 µg/kg)

were injected into the duct in a final volume of 0.3 ml, with a constant flow over a one-minute period, according to Camargo et al (14). The hepatic portion of the biliopancreatic duct was clipped before injecting the solutions, after which the abdomen was closed in two layers. After 4 h of duct injection, the animals were sacrificed and the pancreas, lung and blood samples were collected.

Pancreatic plasma extravasation

Pancreatic plasma protein extravasation was measured by the accumulation of intravenously injected ^{125}I -human serum albumin (2.5 $\mu\text{Ci/rat}$). A blood sample was collected, centrifuged at 8.000 g for 10 min to obtain a plasma sample. The pancreas and plasma samples were counted for radioactivity (γ -counter). Plasma extravasation was expressed as the volume (μl) of plasma accumulated at each pancreas compared to total counts in 1 ml of plasma (19).

Pancreatic and lung myeloperoxidase (MPO) activity

The pancreas and lung were collected and placed in a test tube in the presence of 0.5% of hexadecyltrimethylammonium bromide in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.0. Each tissue sample was homogenized and 1-ml aliquots of the homogenate were decanted into Eppendorf tubes. These tubes were then centrifuged at 14,000 rpm for 2 min, and the supernatants were collected. An MPO assay was performed using a microliter plate scanner (Spectra Max 34, Molecular Devices, USA). This consisted of mixing 5 μl of sample with 200 μl of *o*-dianisidine solution (0.167 mg/ml of *o*-dianisidine dihydrochloride and 0.0005% hydrogen peroxide) prior to reading the plate. The changes in absorbance were measured at 460 nm for 15 sec over a period of 5 min. The MPO activity was expressed as MPO units/mg of tissue. One unit of MPO activity was defined as that degrading 1 μmol of peroxide/min at 25°C (20).

Serum α -amylase levels determination

The serum α -amylase levels were measured using a commercial kit (LaborLab, São Paulo, Brazil). The values were expressed as units of enzyme (U)/l. This method is based in the hydrolysis of the synthetic specific substrate (2-chloro-4-phenyl-galactate piranosil maltodiose) by the α -amylase, generating the cloronitrophenol, which absorbance is detected at 405 nm.

Serum TNF- α levels determination

The TNF- α levels were measured in serum using commercially available enzyme-linked immunosorbent assays according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Statistical analysis

Results were expressed as mean values $\pm$ S.E.M. for n animals. The values were analysed by ANOVA followed by Bonferroni's modified t test and $P < 0.05$ was taken as significant.

Results

Effect of tachykinin NK₁ and bradykinin B₂ receptor antagonists on the pancreatic inflammatory responses induced by sPLA₂

The injection of sPLA₂ (from *Naja mocambique mocambique* venom) in the common bile duct at 300 μ g/kg (4 h) increased by 65% the plasma protein extravasation compared with saline (Fig. 1). Pretreatment of rats with the tachykinin NK₁ receptor antagonist SR140333 (120 nmol/kg, given both i.v. 15 min before and s.c. before the induction) largely reduced the increased plasma protein extravasation (Fig. 1). Similarly, the treatment of the animals with the bradykinin B₂ receptor antagonist icatibant (100 nmol/kg, given both s.c. 30 min before and s.c. 1 h after the induction) nearly abolished the increased plasma protein extravasation (Fig. 1).

The measurement of MPO levels in the pancreatic tissue, used as an index of neutrophil infiltration, revealed an increase of 230% in the sPLA₂ group compared with saline-injected rats (Fig 2A). Pretreatment of rats with either SR14033 or icatibant partly (but significantly) reduced the increased MPO levels (Fig 2A).

Effect of SR140333 and icatibant on the remote lung injury induced by sPLA₂

Figure 2B shows that injection of *Naja mocambique mocambique* sPLA₂ in the common bile duct caused a marked increase in the pulmonary neutrophil influx (as evaluated by the increased MPO levels) compared with the saline group. Treatment with icatibant (but not with SR140333), significantly attenuated the neutrophil infiltration in the lung tissue.

Effect of SR140333 and icatibant on the serum levels of amylase and TNF- α

The serum levels of amylase were significantly higher in the sPLA₂-injected rats compared with the saline group (Fig. 3A). Treatment with icatibant normalized the serum levels of amylase, whereas SR140133 had no significant effect. The serum levels of TNF- α were also significantly higher in the sPLA₂-injected rats compared with the saline group (Fig. 3B). Both icatibant and SR140333 treatment nearly normalized the increased TNF- α levels.

Discussion

Injection of exogenous sPLA₂s into the common bile duct causes acute pancreatitis in rats as evidenced by the increase in pancreatic plasma extravasation, pancreatic and lung neutrophil accumulation, and increased amylase serum levels (14). The present study shows that the peptides substance P and bradykinin take part in the sPLA₂-induced acute pancreatitis by mechanisms possibly involving TNF- α release. However, whilst bradykinin mediates both the local (pancreatic) and remote (lung) inflammation, substance P seems to act preferentially in pancreas causing plasma protein extravasation and neutrophil infiltration.

The tachykinins are widely distributed neuropeptides that share a common carboxyl terminus whose best-known member is substance P. This peptide activates preferentially tachykinin NK-1 receptors, triggering the neurogenic inflammatory effects in innervated tissues, consisting of local vasodilatation, plasma protein leakage and oedema formation (21,22), which may be accompanied by neutrophil accumulation (23). The acinar cell expression of NK-1 receptors and substance P levels in mice pancreas are both increased during pancreatitis induced by the secretagogue caerulein (24). The caerulein-induced pancreatitis (characterized by pancreatic plasma extravasation, hyperamylasemia and elevated MPO levels in pancreas and lungs) was also significantly attenuated in NK-1 knockout mice, indicating that substance P greatly contributes to the acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury (24,25). Moreover, a NK-1 receptor antagonist (CP 96,345) has been shown to protect against acute pancreatitis and associated lung injury induced by caerulein in rats and mice (25,26). This treatment also suppressed the mRNA expression for preprotachykinin-A gene (PPT-A), preprotachykinin-C (PPT-C) and NK-1

receptor in pancreas and/or lungs in mice (27). The use of both NK-1 and neural endopeptidase knockout mice has also showed that substance P plays an important role in determining the lethality in the necrotizing pancreatitis model (28). Bradykinin is another peptide believed to play an important role in triggering acute pancreatitis in animals. Bradykinin is rapidly formed both in plasma and in pancreatic tissue by the action of the serine proteases kallikreins, exerting its effects mainly through the activation of B₂ receptors (29). Endogenous kinins are reported to mediate the oedema formation in the cerulein-induced pancreatitis (30), an effect blocked either by antagonizing the B₂ receptor (31) or by inhibiting the tissue kallikreins (32). In the duct ligation-induced pancreatitis model, use of plasma kininogen-deficient rats or B₂ receptor antagonists has shown to decrease pancreatic edema and serum levels of amylase and lipase (17). In our study, the NK-1 and B₂ receptor antagonists (SR140333 and icatibant, respectively) largely reduced the sPLA₂-induced pancreatic plasma extravasation and partly (but significantly) reduced the pancreatic neutrophil influx. Furthermore, icatibant, better than SR140333, decreased the remote lung neutrophil infiltration and serum amylase levels. These findings strongly suggest that substance P and bradykinin mediate, at least partly, the sPLA₂-induced pancreatitis in rats.

Tumour necrosis factor (TNF- α) is an inflammatory cytokine involved in the pathogenesis of diverse inflammatory conditions, including the local and remote inflammation during acute pancreatitis. Acinar cells are able to produce TNF- α , and in addition TNF- α mRNA and protein were found within the pancreas (33-35). Besides, remote tissues, such as lung, liver and spleen can contribute to the TNF- α production in this disorder (36). In our study, we detected increased levels of circulating TNF- α during the sPLA₂-induced pancreatitis, which were almost abolished by the antagonism of the either NK-1 or B₂ receptors. This finding may suggest that TNF- α release may be a consequence of substance P and bradykinin generation during sPLA₂-induced pancreatitis. TNF- α is known to amplify plasma extravasation and leukocyte accumulation into tissues, two important properties comprising the acute pancreatitis, probably through activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor κ B (3,37). Accordingly, early studies have shown that substance P and bradykinin stimulates the TNF- α release in human monocytes and macrophages, respectively (38-40). However, we cannot ascertain from our

present study the mechanisms by which the biliopancreatic injection of a sPLA₂ causes the release of substance P and bradykinin, thus triggering the acute pancreatitis. Of interest, venom sPLA₂s are able to increase the microvascular permeability in the animal skin (41,42) by mechanisms partly requiring integrity of the sensory fibers supplying the cutaneous microcirculation, showing that substance P can be released in response to sPLA₂s (43,44). Venom sPLA₂s are reported to be able to attract neutrophils in vivo (45) and in vitro (46) by mechanisms involving interactions of sPLA₂ with cell surface glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family that ultimately lead to the release of chemoattractant mediators. It is also worth mentioning that a link between substance P and bradykinin has been described in some tissues, including the pancreas. Previous studies showed that part of the biological actions of bradykinin are due to its ability to stimulate primary sensory neurons causing the release of substance P from their peripheral nerve endings (47-50). In the mouse pancreas, bradykinin induces plasma extravasation by stimulating tachykinin release, reinforcing that bradykinin can act as an activator of sensory nerves and thus mediating its effects (51).

Taken together, our data indicate that substance P and bradykinin, acting respectively via NK-1 and B₂ receptors, exert important proinflammatory roles in the local and remote inflammation during the acute pancreatitis induced by sPLA₂, and that antagonists of these classes of peptides may be of beneficial value in treating this type inflammatory condition.

References

1. Bhatia M. Novel therapeutic targets for acute pancreatitis and associated multiple organ dysfunction syndrome. *Curr Drug Targ Inflamm Allergy* 2002;1:343–351.
2. Yadav D, Lowenfels AB. Trends in the epidemiology of the first attack of the acute pancreatitis: a systematic review. *Pancreas* 2006;33:323-330.
3. Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, et al. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 2000;190,117-125.
4. Liddle RA, Nathan JD. Neurogenic inflammation and pancreatitis. *Pancreatolgy* 2004;4:551-559.

5. Kudo I, Murakami M. Phospholipase A₂ enzymes. Prostaglandins Other Lipid Mediators. 2002;68-69:3-58.
6. Balsinde J, Balboa MA, Insel PA, et al. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1999;39:175-189.
7. Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. Biochim Biophys Acta. 2000;1488(1-2):1-19.
8. Buchler M, Malfertheiner P, Schadlich H, et al. Role of phospholipase A₂ in human acute pancreatitis. Gastroenterol 1989;97(6):1521-1526.
9. Grönroos JM, Nevalainen TJ. Increased concentrations of synovial-type phospholipase A₂ in serum and pulmonary and renal complications in acute pancreatitis. Digestion 1992;52(3-4):232-236.
10. Miura M, Endo S, Kaku LL, et al. Plasma type II phospholipase A₂ levels in patients with acute pancreatitis. Res Commun Mol Pathol Pharmacol 2001;109(3-4):159-164.
11. Aufenanger J, Samman M, Quintel M, et al. Pancreatic phospholipase A₂ activity in acute pancreatitis: a prognostic marker for early identification of patients at risk. Clin Chem Lab Med. 2002;40:293-297.
12. Uhl W, Schrag HJ, Schmitter N, et al. Pathophysiological role of secretory type I and II phospholipase A₂ in acute pancreatitis: an experimental study in rats. Gut. 1997;40(3):386-392.
13. Makela A, Kuusi T, Nuutinen P, et al. Phospholipase A₂ activity in body fluids and pancreatic tissue in patients with acute necrotising pancreatitis. Eur J Surg. 1999;165(1):35-42.
14. Camargo EA, Esquisatto LC, Esquisatto, MA, et al. Characterization of the acute pancreatitis induced by secretory phospholipases A₂ in rats. Toxicon 2005;46(8):921-926.
15. Emonds-Alt X, Doutremepuich JD, Heaulme M, et al. In vitro and in vivo biological activities of SR140333, a novel potent non-peptide tachykinin NK₁ receptor antagonist. Eur J Pharmacol. 1993;250:403-413.
16. Costa SKP, Esquisatto LCM, Camargo E, et al. Comparative effect of *Phoneutria nigriventer* spider venom and capsaicin on the rat paw oedema. Life Sci. 2001; 69:1573-1585.

17. Hirata M, Hayashi I, Yoshimura K, et al. Blockade of bradykinin B(2) receptor suppresses acute pancreatitis induced by obstruction of the pancreaticobiliary duct in rats. *Br J Pharmacol.* 2002;135:29-36.
18. Storck G. Fat necrosis in acute pancreatitis. Morphological and chemical study in the rat. *Acta Chir. Scand.* 1971;47:1-36.
19. Brain SD, Williams TJ. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br J Pharmacol.* 1985;86:855-860.
20. Bradley PP, Priebe MD, Christensen MD, et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982;78:206-209.
21. Brain S, Lewis GP, Whittle BJ. Actions of phospholipase-A₂ on mast-cell histamine release and paw oedema in the rat. *Br J Pharmacol.* 1977;59(3):440P-441P.
22. Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, et al. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci.* 2004;74(12):1445-1463.
23. Harrison S, Geppetti P. Substance P. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33(6):555-576.
24. Bhatia M, Saluja AK, Hofbauer B, et al. Role of substance P and the neurokinin-1 receptor in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Proc Natl Acad Sci. USA,* 1998;95:4760-4765.
25. Grady EF, Yoshimi SK, Maa J, et al. Substance P mediates inflammatory oedema in acute pancreatitis via activation of the neurokinin-1 receptor in rats and mice. *Br J Pharmacol.* 2000;130(3):505-512.
26. Lau HY, Wong FL, Bhatia M. A key role of neurokinin 1 receptors in acute pancreatitis and associated lung injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;327:509-515.
27. Lau HY, Bhatia M. The effect of CP96,345 on the expression of tachykinins and neurokinin receptors in acute pancreatitis. *J Pathol.* 2006;208(3):364-371.
28. Maa J, Grady EF, Yoshimi SK, et al. Substance P is a determinant of lethality in diet-induced hemorrhagic pancreatitis in mice. *Surgery* 2000;128:232-239.
29. Regoli D, Barabe J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev.* 1980;32:1-46.

30. Griesbacher T, Lembeck F. Effects of the bradykinin antagonist, HOE 140, in experimental acute pancreatitis. *Br. J. Pharmacol.* 1992;107(2):356-360.
31. Griesbacher T, Kolbitsch C, Tiran B, et al. Effects of the bradykinin antagonist, icatibant (Hoe 140), on pancreas and liver functions during and after caerulein-induced pancreatitis in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1995;352(5):557-564.
32. Griesbacher T, Rainer I, Tiran B, et al. Involvement of tissue kallikrein but not plasma kallikrein in the development of symptoms mediated by endogenous kinins in acute pancreatitis in rats. *Br J Pharmacol.* 2002;137(5):692-700.
33. Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, et al. Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor- α . Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest.* 1997;100:1853-1862.
34. Gomez-Cambronero LG, Sabater L, Pereda J, et al. Role of cytokines and oxidative stress in the pathophysiology of acute pancreatitis: therapeutical implications. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2002;1(4):393-403.
35. Ramudo L, Manso MA, Sevillano S, et al. Kinetic study of TNF- α production and its regulatory mechanisms in acinar cells during acute pancreatitis induced by bile-pancreatic duct obstruction. *J Pathol.* 2005;206(1):9-16.
36. Norman JG, Fink GW, Denham W, et al. Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis. A probable mechanism for distant organ dysfunction. *Dig Dis Sci.* 1997;42:1783-1788.
37. Pereda J, Sabater L, Aparisi L, et al. Interaction between cytokines and oxidative stress in acute pancreatitis. *Curr Med Chem.* 2006;13(23):2775-2787.
38. Lotz M, Vaughan JH, Carson DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 1988;241(4870):1218-1221.
39. Tiffany CW, Burch RM. Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *FEBS Lett.* 1989;247(2):189-192.
40. Lee HR, Ho WZ, Douglas SD. Substance P augments tumor necrosis factor release in human monocyte-derived macrophages. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1994;1(4):419-423.
41. Landucci ECT, Pereira MF, Cintra ACO, et al. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: Dissociation between enzymatic and biological activities. *Eur J Pharmacol.* 1998;343:257-263.

42. Landucci EC, de Castro RC, Toyama M, et al. Inflammatory oedema induced by the lys-49 phospholipase A(2) homologue piratoxin-I in the rat and rabbit. Effect of polyanions and p-bromophenacyl bromide. *Biochem Pharmacol.* 2000;59(10):1289-1294.
42. Castro RC, Landucci ECT, Toyama MH, et al. Leukocyte recruitment induced by type II phospholipases A₂ into the rat pleural cavity. *Toxicon* 2000;38:1773-1785.
43. Camara PR, Esquisatto LC, Camargo EA, et al. Inflammatory oedema induced by phospholipases A₂ isolated from *Crotalus durissus* sp. in the rat dorsal skin: a role for mast cells and sensory C-fibers. *Toxicon* 2003;41(7):823-829.
44. Teixeira CF, Landucci EC, Antunes E, et al. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. *Toxicon* 2003;42(8):947-962.
46. Gambero A, Landucci ECT, Toyama MH, et al. Human neutrophil migration in vitro induced by secretory phospholipases A₂: a role for cell surface glycosaminoglycans. *Biochem Pharmacol.* 2002;63(1):65-72.
47. Geppetti P, Maggi CA, Perretti F, et al. Simultaneous release by bradykinin of substance P- and calcitonin gene-related peptide immunoreactivities from capsaicin-sensitive structures in guinea-pig heart. *Br J Pharmacol.* 1988;94(2):288-90.
48. Saria A, Martling CR, Yan Z, et al. Release of multiple tachykinins from capsaicin-sensitive sensory nerves in the lung by bradykinin, histamine, dimethylphenyl piperazinium, and vagal nerve stimulation. *Am Rev Respir Dis.* 1988;137(6):1330-1335.
49. Perkins MN, Forster PL, Dray A. The involvement of afferent nerve terminals in the stimulation of ion transport by bradykinin in rat isolated colon. *Br J Pharmacol.* 1988;94(1):47-54.
50. Linardi A, Costa SK, da Silva GR, et al. Involvement of kinins, mast cells and sensory neurons in the plasma exudation and paw oedema induced by staphylococcal enterotoxin B in the mouse. *Eur J Pharmacol.* 2000;399(2-3):235-242.
51. Figini M, Emanuelli C, Grady EF, et al. Substance P and bradykinin stimulate plasma extravasation in the mouse gastrointestinal tract and pancreas. *Am J Physiol.* 1997;272:G785-G793.

Legends to figures

Figure 1. NK-1 or B₂ receptor antagonism reduces the pancreatic protein extravasation during acute pancreatitis induced by phospholipase A₂ (PLA₂). Saline (vehicle) or PLA₂ from *Naja mocambique mocambique* venom (300 µg/kg) were injected into the common bile duct of rats treated with NK-1 receptor antagonist (SR140333) or B₂ receptor antagonist (Icatibant). Pancreatic plasma protein extravasation was measured 4 h after duct injection. Each column represents the mean ± SEM of 8-10 rats; #P<0.05 compared with the saline group and *P<0.05 compared with the PLA₂ group.

Figure 2. Effects of B₂ and NK-1 receptor antagonism on the local and remote neutrophil accumulation during acute pancreatitis induced by phospholipase A₂ (PLA₂). Saline (vehicle) or PLA₂ from *Naja mocambique mocambique* venom (300 µg/kg) were injected into the common bile duct of rats treated with NK-1 receptor antagonist (SR140333) or B₂ receptor antagonist (Icatibant). Pancreatic (A) or lung (B) myeloperoxidase activity were measured 4 h after duct injection. Each column represents the mean ± SEM of 8-10 rats; #P<0.05 compared with the saline group and *P<0.05 compared with the PLA₂ group.

Figure 3. Effects of B₂ and NK-1 receptor antagonism on the serum amylase and TNF-α levels during acute pancreatitis induced by phospholipase A₂ (PLA₂). Saline (vehicle) or PLA₂ from *Naja mocambique mocambique* venom (300 µg/kg) were injected into the common bile duct of rats treated with NK-1 receptor antagonist (SR140333) or B₂ receptor antagonist (Icatibant). Serum amylase or TNF-α levels were measured 4 h after duct injection. Each column represents the mean ± SEM of 8-10 rats; #P<0.05 compared with the saline group and *P<0.05 compared with the PLA₂ group.

Figure 1
Camargo et al

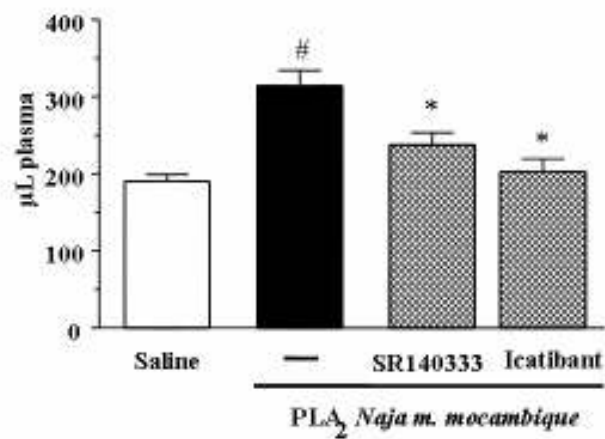


Figure 2
Camargo et al

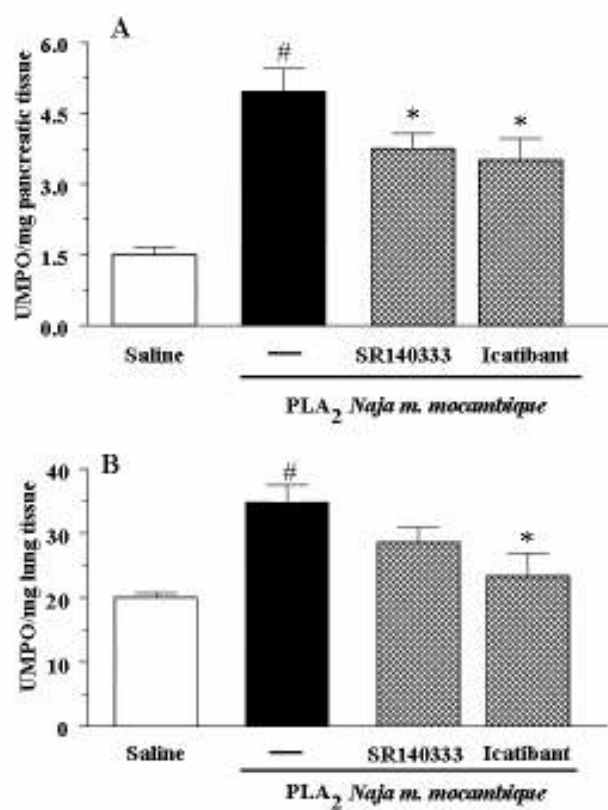


Figure 3
Camargo et al

