UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA

**Expressão Gênica de Marcadores Inflamatórios de Pancreatite
Alcoólica Crônica em Ratos Suplementados com Vitamina E**

THAÍS HELENA MONTEIRO

Dissertação apresentada ao Departamento de Clínica Médica
da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, para
obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Investigação Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Helio Vannucchi

Ribeirão Preto

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Monteiro, Thaís Helena.

Expressão Gênica de Marcadores Inflamatórios de Pancreatite Alcoólica Crônica em Ratos Suplementados com Vitamina E. Ribeirão Preto, 2011. 100f. 30cm.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica. Área de concentração: Investigação Biomédica) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Pancreatite alcoólica crônica. 2. Resposta inflamatória. 3. Vitamina E. 4. PCR quantitativo em tempo real. 5. Expressão gênica.

Orientador: Vannucchi, Helio.

Data da defesa: 28/01/2011.

THAÍS HELENA MONTEIRO

**Expressão Gênica de Marcadores Inflamatórios de Pancreatite
Alcoólica Crônica em Ratos Suplementados com Vitamina E**

**Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de MESTRE**

**Prof. Dr. Helio Vannucchi
Orientador / Presidente**

1º Examinador

2º Examinador

Ribeirão Preto, 28 de Janeiro de 2011.

DADOS CURRICULARES

THAÍS HELENA MONTEIRO

Nascimento 07 de julho de 1986 – Ribeirão Preto – SP

Filiação Wladimir Hiesinger Monteiro
 Helena da Conceição Bigi Monteiro

2004-2008 Curso de Graduação
 Nutrição e Metabolismo
 Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

2009-2011 Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Médicas
 Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais **Wladimir** e **Helena**, sempre presentes em todos os momentos da minha vida, que não hesitaram em abdicar os próprios desejos em favor dos meus, garantindo-me todo o suporte físico, psicológico e espiritual para que eu enfrentasse os desafios da vida plena de caráter, sabedoria, confiança, simplicidade, beneficência e honestidade, tal qual sempre me exemplificaram com suas próprias atitudes.

Aos queridos irmãos **Patrícia** e **Guilherme**, meus amados dentistas, que souberam desempenhar com afinco o papel de irmãos mais velhos. Obrigada pelo exemplo, cuidado, proteção e carinho. À Paty, pelos conselhos e mimos típicos de uma irmã mais velha, e ao Gui, pela alegria contagiante e preocupação de sempre.

À querida irmã gêmea **Tássia**, luz da minha vida, metade que completa minha essência, com quem até hoje pude dividir todas as experiências da vida, acompanhando-me nas prazerosas e consolando-me nas amargas. Ensinou-me e permitiu-me sempre caminhar confiante, desdobrando-se para servir-me de psicóloga, confidente, amiga, conselheira e ouvinte, sempre alicerçada no amor como único e verdadeiro sentimento de julgamento, sempre possuidora de extrema paciência.

Ao meu amado noivo **Fábio**, o qual demonstrou respeito e apoio frente às minhas próprias decisões, e assumiu com obstinação novos desafios para dar prioridade à nossa união e felicidade. O meu reconhecimento por me permitir almejar a melhoria dos meus defeitos e sobrepujar minhas qualidades, em busca de crescimento pessoal.

Ao querido cunhado **Francisco**, pela dedicação e amor demonstrados, tornando-se naturalmente mais um membro da família.

Aos meus queridos avós **Wilson** (*in memorian*) e **Magdalena** (*in memorian*), **Antonio** e **Maria da Penha** (*in memorian*), os quais fisicamente longe ou perto, espiritualmente sempre manifestaram presença e amor incondicionais, seja por meio de orações, preocupações e intenções, desempenhando papel fundamental em minha vida.

À toda minha família, a quem amo incondicionalmente!

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Helio Vannucchi**, por esta e todas as outras oportunidades as quais me confiou, servindo-me muito mais que um orientador. O meu reconhecimento e eterna gratidão.

Ao **Prof. Dr. Sergio Zucoloto**, pela atenção e conhecimentos que enriqueceram minha formação, e pelo auxílio e orientação para a análise histopatológica.

Ao querido **Thiago Bigi**, o primo-irmão que, apesar da distância, se faz sempre presente.

À querida amiga **Camila Siqueira Silva**, por ter me recebido com a razão e a emoção, por ter se dedicado com bastante empenho para meu aprendizado científico, e pela confiança em permitir-me descobrir o gosto pela ciência.

À **Livia M. C. Simões Ambrósio**, pela amizade, carinho e dedicação de sempre, os quais foram indispensáveis para o resultado final do trabalho.

À **Fernanda Aparecida Domenici**, sempre solícita e prestativa, pelo apoio em algumas etapas do trabalho, e pelos momentos de alegria, desabafo e descontração.

À **Mônica S. S. Meirelles**, pela amizade e suporte técnico que contribuiu para o trabalho.

Às colegas do laboratório de nutrição **Célia Cohen**, **Maria J. F. Brochado**, **Raquel A. dos Santos** e **Profª Drª Vera L. C. G. Tramonte**, pelos momentos de descontração e desabafos.

Às amigas **Daphne S. Leonardi**, **Patrícia V. Contri** e **Bianca B. de Almeida**, pelo companheirismo e amizade na pós-graduação, com direito a viagem para congresso no Chile.

Às amigas **Ana Lécia C. da Silva**, **Amanda F. Canale** e **Érika S. Ikeda**, pelo companheirismo na graduação.

Ao querido amigo **César Gonçalves Cintra**, por nunca desistir de nossa amizade e se fazer sempre presente.

Ao querido amigo **Luciano A. L. Saraiva**, por acompanhar com tanto carinho todo meu processo de amadurecimento desde a entrada na faculdade até a decisão final da pós-graduação.

À **Aurea A. T. Gutierrez**, pelo convívio, carinho e atenção.

Aos colegas do Biotério do Departamento de Clínica Médica da FMRP – USP, **Adalberto V. Verceze**, **Mauricio R. de Arantes** e **Roni C. Fabbris**, pela infinita alegria contagiante, e cuja ajuda tornou o trabalho mais fácil e agradável.

Ao amigo **João F. R. Cardoso** e às técnicas do Laboratório de Patologia, **Laura** e **Márcia**, pela cordialidade e disposição em sempre atender.

Aos secretários da Seção de Pós-Graduação do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP, **Adriana A. D. Ferreira** e **Émerson Q. de Oliveira**, pela atenção sempre concedida.

Ao **Centro de Métodos Quantitativos (CEMEQ)** da FMRP/USP, pela assessoria estatística.

À **CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	09
RESUMO	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo Geral	25
2.2. Objetivos Específicos	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Animais e dietas	27
3.2. Análise histopatológica	33
3.2.1. Pâncreas	33
3.2.2. Fígado	33
3.3. Determinação de vitamina E (α -tocoferol)	34
3.3.1. Determinação plasmática de α -tocoferol.....	34
3.3.2. Determinação hepática de α -tocoferol.....	34
3.4. Determinação hepática de lipídeos totais	35
3.5. Extração de RNA total	35
3.6. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	36
3.7. Análise estatística	38
4. RESULTADOS	39
4.1. Ingestão de dieta	40
4.2. Variação do peso corporal	42
4.3. Análise histopatológica	43
4.3.1. Pâncreas	43
4.3.2. Fígado	45
4.4. Níveis plasmáticos e hepáticos de α -tocoferol	48
4.5. Níveis hepáticos de lipídeos totais	49
4.6. Expressão gênica	50
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÃO	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXO.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH = Álcool desidrogenase

α -SMA = *Smooth muscle alpha-actin*

CCK = Colecistoquinina

Cer = Ceruleína

Col1a1 = *Collagen, type I, alpha 1*

COMT = *Catechol-O-methyl transferase*

COX-2 = Ciclooxygenase 2

CsA = Ciclosporina A

CYP2E1 = Citocromo P450, família 2, subfamília E, polipeptídeo 1

18S = *18S Ribosomal RNA*

DTH = Resposta hipersensitiva do tipo tardia (*Delayed-type hypersensitivity*)

HAEC = *Human aortic endothelial cells*

H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio

HE = Hematoxilina e Eosina

HPLC = *High-Performance Liquid Chromatography*

Hsp70 = *Heat shock protein*

ICAM-1 = *Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*

IL = Interleucina

MCP-1 = *Monocyte chemoattractant protein*

Mif = *Macrophage migration inhibitory factor*

MIP-3 α = *Macrophage inflammatory protein*

MMP = *Matrix metalloproteinase*

NDUFB6 = *NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 β subcomplex 6*

NF- κ B = *Nuclear Factor- κ B*

NKT = *Células natural killers*

O₂⁻ = Radical superóxido

PAC = Pancreatite alcoólica crônica

Pap = *Pancreatitis-associated protein*

PGE₂ = Prostaglandina E₂

PPAR- γ = *Peroxisome proliferator-activated receptors gamma*

ROS = *Reactive Oxygen Species*

RT-qPCR = *Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction*

TGF = *Transforming Growth Factor*

TLR-4 = *Toll-like receptor*

TNF- α = *Tumoral Necrosis Factor-alpha*

VCAM-1 = *Vascular cell adhesion molecule 1*

VCT = Valor calórico total

Resumo

RESUMO

O infiltrado inflamatório, a perda maciça de células acinares e a fibrose se destacam como alterações da pancreatite alcoólica crônica, o que é reflexo da expressão gênica. O α -tocoferol regula a expressão de vários genes, entre eles moduladores de proteínas extracelulares e de inflamação. O presente trabalho teve como intuito avaliar o efeito da suplementação com vitamina E sobre a expressão gênica pancreática de marcadores inflamatórios, em ratos com pancreatite alcoólica crônica induzida por dieta líquida contendo etanol (com ou sem suplementação de α -tocoferol), ciclosporina A e ceruleína, por meio da técnica quantitativa de PCR em tempo real. Além disso, foram realizadas determinações de α -tocoferol plasmático e hepático, lipídeos totais hepáticos, e análise histopatológica do pâncreas e fígado dos animais submetidos aos diferentes tratamentos (Grupo 1: Controle; Grupo 2: Pancreatite alcoólica crônica; Grupo 3: Pancreatite alcoólica crônica e suplementação com vitamina E).

Os animais que receberam suplementação com vitamina E apresentaram maiores valores de α -tocoferol plasmático e hepático [(G1: $14,27 \pm 1,5$ μ mol/L plasma; $125,47 \pm 18,5$ nmol/g fígado; $5,1 \pm 0,8$ nmol/mg lipídeo hepático); (G2: $21,64 \pm 3,0$ μ mol/L plasma; $126,54 \pm 10,5$ nmol/g fígado; $2,8 \pm 0,7$ nmol/mg lipídeo hepático); (G3: $43,91 \pm 6,1$ μ mol/L plasma*; $1595,90 \pm 802,7$ nmol/g fígado*; $17,3 \pm 8,8$ nmol/mg lipídeo hepático*)] (* $p < 0,01$). O pâncreas dos animais do Grupo 1 apresentou histologia normal, ao passo que nos Grupos 2 e 3 apresentou focos de destruição tecidual leve a moderada, presença de infiltrado de células mononucleares (linfócitos e plasmócitos) e proliferação de tecido conjuntivo de sustentação, mostrando um quadro ainda em estágios iniciais de pancreatite alcoólica crônica. O fígado do Grupo 1 apresentou histologia normal, e dos Grupos 2 e 3, esteatose macro e microvesicular em grau variável, entre 30 a 60%.

A análise de PCR quantitativo em tempo real mostrou aumento de expressão de todos os 13 genes biomarcadores do processo inflamatório nos Grupos 2 e 3, provocado pela pancreatite alcoólica crônica, em relação ao Grupo 1 ($p < 0,01$). A suplementação com vitamina E na presença de pancreatite no Grupo 3, em relação ao Grupo 2, diminuiu o número de transcritos para 5 genes (α -SMA, COX-2, IL-6, MIP-3 α , TNF- α) ($p < 0,01$), aumentou o número de transcritos para 1 gene (Pap) ($p < 0,01$), e não modificou os 7 genes restantes (Col1a1, IL-4, IL-8, IL-10, MCP-1, Mif, MMP-2) ($p > 0,05$).

A suplementação com vitamina E apresentou efeitos anti-inflamatórios e benéficos na expressão gênica pancreática de alguns biomarcadores do processo inflamatório em ratos com pancreatite alcoólica crônica, comprovando sua participação em alguns mecanismos da resposta inflamatória no pâncreas.

Palavras-chave: pancreatite alcoólica crônica; resposta inflamatória; vitamina E; PCR quantitativo em tempo real; expressão gênica.

Abstract

ABSTRACT

The inflammatory infiltrate, the massive loss of acinar cells and fibrosis are highlighted as changes in alcoholic chronic pancreatitis, which is a gene expression reflection. The α -tocopherol regulates many genes expression, including extracellular proteins and inflammation modulators. This study was aimed to evaluate the vitamin E supplementation effect on pancreatic gene expression of inflammatory markers in rats with alcoholic chronic pancreatitis induced by liquid diet containing ethanol (with or without α -tocopherol supplementation), cyclosporin A and cerulein through the quantitative real time PCR technique. Moreover, α -tocopherol content in plasma and liver were analyzed, total lipid content in liver, and pancreas and liver histopathology of animals subjected to different treatments (Group 1: Control, Group 2: Alcoholic chronic pancreatitis, Group 3: Alcoholic chronic pancreatitis and vitamin E supplementation).

The animals that received vitamin E supplementation had higher α -tocopherol amounts in plasma and liver [(G1: $14,27 \pm 1,5 \mu\text{mol/L}$ plasma; $125,47 \pm 18,5 \text{ nmol/g}$ liver; $5,1 \pm 0,8 \text{ nmol/mg}$ liver lipid); (G2: $21,64 \pm 3,0 \mu\text{mol/L}$ plasma; $126,54 \pm 10,5 \text{ nmol/g}$ liver; $2,8 \pm 0,7 \text{ nmol/mg}$ liver lipid); (G3: $43,91 \pm 6,1 \mu\text{mol/L}$ plasma*; $1595,90 \pm 802,7 \text{ nmol/g}$ liver*; $17,3 \pm 8,8 \text{ nmol/mg}$ liver lipid*)] (* $p < 0,01$). The pancreas of animals in Group 1 had normal histology, whereas in Groups 2 and 3 presented tissue destruction foci with mild to moderate mononuclear cells infiltration (lymphocytes and plasma cells) and connective tissue proliferation, showing an early stage occurrence of alcoholic chronic pancreatitis. The Group 1 liver showed normal histology, and Groups 2 and 3, macro and microvesicular steatosis in varying degrees, from 30 to 60%.

The quantitative real time PCR analysis showed increased expression of all 13 inflammatory biomarkers genes in Groups 2 and 3, caused by alcoholic chronic pancreatitis, compared to Group 1 ($p < 0,01$). Vitamin E supplementation in the presence of pancreatitis in Group 3, compared to Group 2, decreased the transcripts number for five genes (α -SMA, COX-2, IL-6, MIP-3 α , TNF- α) ($p < 0,01$), increased the transcripts number for one gene (Pap) ($p < 0,01$), and did not alter the seven remaining genes (Col1a1, IL-4, IL-8, IL-10, MCP-1, Mif, MMP-2) ($p > 0,05$).

Vitamin E supplementation showed anti-inflammatory and beneficial effects on pancreatic gene expression of some inflammation biomarkers in rats with alcoholic chronic pancreatitis, confirming its participation in the inflammatory response mechanisms in the pancreas.

Keywords: alcoholic chronic pancreatitis; inflammation; vitamin E; quantitative real time PCR; gene expression.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O alcoolismo consiste em um dos maiores fatores de risco e etiológicos na patogênese da pancreatite (WILSON & APTE, 2003). O pâncreas pode metabolizar o etanol pelas vias oxidativa e não-oxidativa, e por isso está exposto aos efeitos diretos tanto do acetaldeído quanto dos etil-ésteres de ácidos graxos. Assim, o metabolismo do etanol e conseqüente síntese de metabólitos tóxicos desempenham papel importante no desenvolvimento da injúria pancreática no alcoolismo (WILSON & APTE, 2003).

Na via oxidativa, além da ação da álcool desidrogenase (ADH), o etanol é metabolizado pelo citocromo P4502E1 (CYP2E1), resultando na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem iniciar o dano tecidual por meio da ativação do fator de transcrição NF- κ B e aumento de expressão de citocinas pró-inflamatórias (PUROHIT et al., 2003). Além disso, o consumo de etanol compromete os mecanismos de defesa antioxidante da célula (glutathione, glutathione peroxidase, superóxido dismutase, catalase, e cofatores tais como a vitamina E, zinco, selênio), comprometendo o balanço oxidativo. Supõe-se que o estresse oxidativo induzido pelo etanol e o acetaldeído tenham papel na mediação da ativação das células pancreáticas (APTE et al., 2000).

O pâncreas sintetiza e secreta enzimas na sua forma inativa, denominadas zimógenos. Sob condições basais, estas pró-enzimas permanecem inativas desde sua síntese, transporte intracelular e secreção até alcançarem o lúmen intestinal, onde são ativadas. Um dos mecanismos relacionados com a patogênese da pancreatite alcoólica é a sensibilização das células acinares à ativação intracelular prematura de zimógenos (LERCH et al., 2003; PUROHIT et al., 2003). Embora o etanol não apresente um efeito direto na ativação de zimógenos, ele potencializa o

efeito da colecistoquinina (CCK). Em condições normais, este hormônio, produzido pelas células duodenais, estimula a secreção das pró-enzimas proteolíticas pelo pâncreas, contudo, sob o estímulo do etanol, altas doses de CCK podem desencadear a ativação intracelular prematura de zimógenos, ocasionando a autodigestão do órgão (PUROHIT et al., 2003). Estudos clínicos e experimentais mostram que os peptídeos ativos do tripsinogênio e da carboxipeptidase A₁, ambos marcadores da ativação zimogênica, foram detectados no soro nas primeiras horas de pancreatite aguda (APPELROS et al., 1998; GUDGEON et al., 1990).

O alcoolismo crônico está associado com 15% a 30% dos casos de pancreatite aguda e 50% a 70% de pancreatite crônica (GREENSBERGER & TOSKES, 2005; ETEMAD & WHITCOMB, 2001). Entre pacientes com pancreatite crônica, cerca de 60 a 90% dos casos possui um histórico de alto consumo de bebidas alcoólicas (PUROHIT et al., 2003).

Uma baixa porcentagem de humanos alcoólatras desenvolve patologias no pâncreas, e inúmeros estudos têm indicado que a administração alcoólica crônica isolada não causa pancreatite em modelos animais (GUKOVSKY et al., 2008; LI et al., 2008). Segundo Li e cols. (2008), a administração alcoólica crônica em modelo animal durante seis meses não está relacionada à ocorrência de pancreatite, porém leva ao comprometimento da função pancreática exócrina. Portanto, sabe-se que apenas o consumo isolado de álcool não é suficiente para o desenvolvimento da pancreatite, mas parece alterar o estado basal pancreático, tornando-o susceptível a outras injúrias. O consumo alcoólico crônico em animais está associado com elevada sensibilidade do pâncreas ao dano induzido por secretagogos (KUBISCH et al., 2006; PANDOL et al., 1999). Contudo, os mecanismos moleculares pelos quais o etanol sensibiliza o pâncreas à injúria ainda não estão claros.

Gukovsky e cols. (2008) também não encontraram indução de pancreatite em animais após 8 semanas de tratamento isolado com etanol, porém, ao injetarem ciclosporina A (CsA), um imunossupressor, a partir da 7ª semana de tratamento e ceruleína (Cer), um análogo da colecistoquinina, no início da 8ª semana de tratamento desses animais, conseguiram induzir a pancreatite crônica. Vale ressaltar que o tratamento separado de CsA e de Cer, independente da ingestão de etanol, não resultou em injúria pancreática, sendo que o álcool agravou os efeitos patológicos induzidos pelo tratamento combinado de CsA + Cer no pâncreas. No Grupo controle + CsA + Cer, o qual não ingeriu etanol, houve restauração das estruturas acinares do pâncreas após uma semana da indução aguda de pancreatite pela administração de Cer. No grupo Etanol + CsA + Cer, após uma semana da indução aguda por Cer, houve progressão para pancreatite alcoólica crônica.

Além do modelo experimental com CCK ou Cer, a duração do tratamento com etanol também é responsável pela discrepância encontrada na literatura sobre o efeito do etanol no pâncreas, que pode variar de 4 semanas a 16 meses (PERIDES et al., 2005; LÓPEZ et al., 1996). Há relatos de indução de pancreatite aguda com menos de 4 semanas de administração de etanol (DENG et al., 2005; NORTON et al., 1998). Por outro lado, se a duração do tratamento for maior do que 1 ano, os resultados podem ser influenciados pelo efeito do envelhecimento. Alguns estudos já encontraram alterações crônicas no tecido pancreático com 4 semanas de tratamento (DAS et al., 2006; PFÜTZER et al., 2002), mas os que utilizaram 8 semanas encontraram alterações em maior número de marcadores de injúria pancreática (GUKOVSKY et al., 2008; KUBISCH et al., 2006).

A ocorrência de pancreatite pode ser comprovada pela verificação histológica de perda maciça de células acinares, infiltração inflamatória persistente e fibrose (LI

et al., 2008). Na injúria pancreática, ocorre considerável alteração na atividade de alguns marcadores inflamatórios. Li e cols. (2005a) encontraram aumento na expressão gênica do receptor “*toll-like*” (TLR-4), um mediador do sinal intracelular da resposta inflamatória, no epitélio do ducto pancreático, no endotélio vascular e nas ilhotas em modelo animal de pancreatite induzida por Cer. TLR-4 desencadeia a ativação do fator nuclear kappa B (NF-kB) que, por sua vez, controla a liberação de citocinas (HIETARANTA et al., 2004; CHEN et al., 2002). Schlosser e cols. (2002) verificaram aumento na expressão de ciclooxigenase 2 (COX-2), outro importante mediador da resposta inflamatória, em pacientes com pancreatite crônica. Haber e cols. (1999) descreveram mecanismo no qual a inflamação crônica possivelmente ativa a proteína alfa actina do músculo liso (α -SMA) no tecido pancreático, e inicia o processo de fibrose. Li e cols. (2008) não encontraram alteração na atividade dos marcadores inflamatórios TLR-4, NF-kB, COX-2 e α -SMA em animais recebendo etanol por seis meses. Porém, neste estudo não houve ocorrência de pancreatite alcoólica, mas apenas pequenas alterações na microestrutura da função exócrina decorrentes do metabolismo do etanol (LI et al., 2008).

Em modelos animais, sabe-se que ocorre considerável alteração na expressão gênica do pâncreas após administração de etanol (KUBISCH et al., 2006; PERKINS et al., 1995). Kubisch e cols. (2006), ao avaliarem o perfil global de expressão gênica do pâncreas de ratos tratados com etanol, mostraram que um número inesperado de genes sofre mudanças em sua expressão, sendo provável que vários deles possam estar envolvidos na sensibilização do pâncreas à injúria. Segundo este estudo, o consumo alcoólico crônico aumenta a predisposição do pâncreas a outros agentes lesivos por meio da alteração do estado basal do órgão e redução dos mecanismos de defesa do tecido, o que é refletido na expressão

gênica. Dessa forma, foi observado aumento na expressão de alguns genes e supressão de outros, o que explicaria a relação do etanol com a indução de lesão às células pancreáticas (KUBISCH et al., 2006).

Segundo Gukovsky e cols. (2008), após constatada a ocorrência de pancreatite alcoólica induzida por Cer e CsA, houve aumento na ativação de NF- κ B e na expressão gênica de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), IL-10, proteína de quimioatração de monócito 1 (MCP-1), fator de inibição da migração de macrófago (MIF), proteína inflamatória de macrófago 3 alfa (MIP-3 α), metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e -9) e colágeno do tecido pancreático. MCP, MIF e MIP estão envolvidos com a quimioatração de monócitos, macrófagos e linfócitos respectivamente, e MMP atua como mediador do processo de reparo do tecido pancreático. Ainda, McDonough (2003) sugere que NF- κ B possivelmente é ativado quando há injúria oxidativa, como ocorre na ingestão crônica de etanol. Grady e cols. (1997) verificaram, por *Northern Blot*, que diferentes quimiocinas, como o MCP-1, têm sua expressão aumentada nas células acinares do pâncreas imediatamente após a estimulação aguda por Cer, ou seja, em estágios iniciais da pancreatite aguda. Em estudo de Das e cols. (2009), o consumo alcoólico crônico ocasionou o aumento dos níveis séricos de IL-10 e de TNF- α , e diminuição da IL-4.

Kubisch e cols. (2006) verificaram diminuição na expressão gênica da proteína associada à pancreatite (Pap; *pancreatitis associated protein*) após oito semanas de consumo de etanol em ratos. Trata-se de uma proteína encontrada no sangue, e tecido e suco pancreáticos, e cuja função ainda não está completamente esclarecida. Supõe-se ser uma molécula com função protetora contra a injúria pancreática, sendo que sua menor expressão está relacionada ao aumento na resposta inflamatória, com aumento da expressão de IL-1 e IL-4 em modelo de

pancreatite aguda (ZHANG et al., 2004). Giromella e cols. (2005) verificaram que a injeção direta de Pap na mucosa de ratos com colite evitou a ativação de NF- κ B e de TNF- α , diminuindo a resposta inflamatória, por meio da diminuição da geração de citocinas inflamatórias e de moléculas de adesão.

O consumo de etanol, além das alterações em expressão gênica, também produz modificações no estado antioxidante do organismo. Estudos em modelos animais demonstram que a deficiência de vitamina E, um antioxidante exógeno, decorrente da baixa ingestão dietética ou do alcoolismo crônico, leva a um aumento nas reações de lipoperoxidação (MCDONOUGH, 2003). Em ratos submetidos a tratamento alcoólico crônico, há redução de vitamina E plasmática e hepática, devido provavelmente à utilização da vitamina no processo de detoxificação e recuperação dos animais (KOCH et al., 2004).

Dentre os oito homólogos naturais da vitamina E, o α -tocoferol é a forma de maior atividade biológica, sendo considerado o mais potente antioxidante de característica lipossolúvel, responsável pela proteção de ácidos graxos poliinsaturados de membranas contra a peroxidação lipídica (BIANCHI & ANTUNES, 1999). A ingestão de vitamina E acima da recomendação, por alimentos ou suplementos, está envolvida com a modulação do sistema imune e de interações das células inflamatórias com tecidos-alvo. Isso pode ocorrer por meio de vários mecanismos, como a inibição da oxidação de LDL-colesterol, redução da liberação de citocinas, inibição da agregação plaquetária pela inibição da COX-2, alteração na proliferação das células do músculo liso, controle do tônus vascular e redução da interação do endotélio vascular com células inflamatórias e do sistema imune (OZER et al., 1995; STEINER, 1991).

Segundo Azzi e cols. (2004), o α -tocoferol pode regular a expressão gênica por meio da modulação de duas principais vias de transdução de sinal, centradas na proteína C quinase e fosfatidilinositol-3-quinase, as quais participam na regulação de vários fatores de transcrição, como NF-kB. Em revisão publicada por Zingg (2007b), o α -tocoferol é capaz de modular enzimas específicas envolvidas com a transdução de sinal, tais como: proteína C quinase, proteína B quinase, proteína tirosina-quinase, lipoxigenases, COX-2, fosfolipase A2, fosfatase protéica 2A, tirosina-fosfato e diacilglicerol quinase. Dessa forma, alguns genes podem ser regulados pelo tocoferol, como genes envolvidos no consumo e degradação de tocoferóis (proteína de transferência de α -tocoferol, citocromo P450 e glutathione-S-transferase); relacionados com o consumo de lipídeos e o processo de aterosclerose; envolvidos na modulação de proteínas extracelulares (tropomiosina, 1- α -colágeno, MMP-1, MMP-19 e fator de crescimento do tecido conjuntivo); conectados à inflamação e adesão (integrinas ICAM-1, IL-2, IL-4 e TGF- β); e implicados na sinalização e na regulação do ciclo celular (PPAR- γ , ciclina-D1 e ciclina-E).

O estresse oxidativo pode contribuir para o declínio das funções cardiovasculares, neuronais, musculares, visuais e imunes. Dessa forma, a ingestão de antioxidantes exógenos, como a vitamina E, é necessária para possibilitar a função normal do sistema imune, e pode até ser necessária em quantidades maiores do que a atual recomendação de ingestão na vigência de um estado pró-inflamatório, como no caso da pancreatite alcoólica (MEYDANI, 2000). Estudos sugerem a participação da vitamina E no sistema imune, modulando a expressão de marcadores inflamatórios e, dessa forma, reduzindo o risco de doenças relacionadas à super ativação da resposta inflamatória, como as doenças cardiovasculares (AZZI et al., 2004; MEYDANI, 2000).

Martin e cols. (1997) mostraram que a suplementação com vitamina E reduziu a adesão de monócitos às partículas de LDL e à interleucina 1 β em células endoteliais da artéria aorta em humanos (HAEC), por meio da supressão da expressão das moléculas de adesão de HAEC, incluindo supressão da molécula de adesão intracelular (ICAM-1) e vascular (VCAM-1), e diminuição na liberação da sua forma solúvel (sICAM-1) (MARTIN et al., 1997; WU et al., 1997). Menores concentrações séricas de sICAM-1 estão associadas ao menor risco de infarto do miocárdio (RIDKER et al., 1998). Wu e cols. (1997) também observaram que a suplementação com vitamina E reduziu a produção de IL-8 e IL-6, que são citocinas pró-inflamatórias, na HAEC.

Outros estudos demonstram que a suplementação de vitamina E levou ao aumento da resposta hipersensitiva do tipo tardia (DTH), da proliferação linfocítica em resposta a um mitógeno e da produção de IL-2, bem como diminuição da produção de prostaglandinas (PGE₂) tanto em modelo animal (MEYDANI et al., 1986) quanto em modelo humano (MEYDANI et al., 1990). Meydani e cols. (1997) observaram redução de 30% na incidência de infecções em um grupo de idosos que receberam suplementação de vitamina E por 235 dias, evidenciando um efeito imunoestimulatório dessa vitamina.

Diante deste contexto, pesquisas adicionais sobre genes de interesse poderão revelar novos aspectos sobre os mecanismos de ação envolvidos na injúria pancreática induzida pelo álcool e auxiliarão no delineamento de novas alternativas terapêuticas. Assim, a análise do comportamento da resposta inflamatória mediante suplementação com vitamina E poderá contribuir para a elucidação sobre os mecanismos que possam estar envolvidos na injúria pancreática decorrente do alcoolismo.

Hipótese:

A vitamina E, em doses suplementares, pode modular a expressão gênica de fatores envolvidos na resposta inflamatória no pâncreas de ratos com pancreatite alcoólica crônica, apresentando um efeito benéfico por meio da supressão de alguns genes pró-inflamatórios e estimulação de outros anti-inflamatórios, resultando em possível estratégia elucidativa dos mecanismos envolvidos com a injúria pancreática crônica decorrente do alcoolismo.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Verificar o efeito da suplementação com vitamina E sobre a expressão gênica pancreática de marcadores inflamatórios em modelo animal de pancreatite alcoólica crônica.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar a expressão gênica pancreática de marcadores inflamatórios relacionados à patogênese da pancreatite em modelo animal de pancreatite alcoólica crônica, na ausência e presença de suplementação com vitamina E.
- Contribuir para o conhecimento das propriedades modulatórias da vitamina E sobre os mecanismos moleculares envolvidos na injúria pancreática, com a finalidade de possivelmente auxiliar no futuro desenvolvimento de novas estratégias para prevenção e tratamento da pancreatite alcoólica crônica.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e dietas

Neste trabalho, foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, com peso médio de 125g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FMRP/USP). Estes animais foram separados em três grupos (com 6 animais no Grupo 1, 10 no Grupo 2 e 10 no Grupo 3), os quais receberam, durante seis semanas, as respectivas dietas líquidas, conforme Lieber e DeCarli (1989), com alterações nas quantidades de α -tocoferol:

Grupo 1 (G1): dieta controle.

Grupo 2 (G2): dieta contendo etanol a 35,5% do valor calórico total (VCT).

Grupo 3 (G3): dieta contendo etanol a 35,5% do VCT e suplementada com vitamina E 20 vezes o recomendado pela AIN-93 (NAP, 1995).

Antes do início do período experimental, foi realizada padronização do preparo da dieta com a finalidade de melhorar sua estabilidade, por meio de testes com os ingredientes, tais como a seqüência de adição, quantidade, solubilidade, precipitação e pH. Os cálculos das quantidades de ingredientes utilizados no preparo das dietas estão representados nas Tabelas 1 a 4. As dietas dos três grupos possuíam a mesma densidade calórica, 1,0 kcal/mL.

As dietas foram diariamente preparadas e oferecidas aos animais. Conforme estudo anterior realizado neste laboratório, a quantidade de vitamina E na dieta suplementada do Grupo 3 foi vinte vezes maior do que a quantidade recomendada para ratos (30 mg de acetato de alfa-tocoferol por Kg de dieta) (SIQUEIRA-SILVA, 2010; REEVES, 1997; NAP, 1995). A quantidade de etanol na dieta dos Grupos 2 e 3, 35,5% do VCT, foi baseada em estudos anteriores com ratos (GUKOVSKY et al., 2008; CHOI et al., 1999; LEO et al., 1997; LIEBER & DECARLI, 1989).

Tabela 1. Composição das dietas líquidas para os ratos (gramas/litro de dieta) (LIEBER & DECARLI, 1989).

Ingredientes	Animais		
	G1 (g/L)	G2 (g/L)	G3 (g/L)
Amido de Milho (85,6%)	16,00	16,00	16,00
Caseína (equivalente a 89,57%de proteína)	49,23	49,23	49,23
Cistina	0,50	0,50	0,50
Metionina	0,30	0,30	0,30
Sacarose	99,30	10,53	10,53
Celulose	10,00	10,00	10,00
Óleo de soja	38,88	38,88	38,88
Mistura Mineral	8,75	8,75	8,75
Mistura Vitamínica	2,50	2,50	---
Mistura Vitamínica Suplementada 20x com vitamina E	---	---	2,50
Cloreto de Colina (0,2%)	0,25	0,25	0,25
Sorbato de potássio	3,50	3,50	3,50
Etanol	---	50,00	50,00

* As dietas foram preparadas para fornecer 1 kcal/mL.

* Do total das calorias da sacarose foi descontada a quantidade de amido utilizada como espessante.

G1: Controle sem tratamento; G2: Pancreatite alcoólica crônica; G3: Pancreatite alcoólica crônica + Vitamina E.

Tabela 2. Características da dieta do Grupo 1 (gramas/litro de dieta).

Ingredientes	g/L	Kcal	PTN (g)	CHO (g)	LIP (g)
Amido de Milho	16,00	56,16	0,10	13,94	0
Caseína (equivalente a 89,57%de proteína)	49,23	176,40	44,10	0	0
Cistina	0,50	2,00	0,50	0	0
Metionina	0,30	1,20	0,30	0	0
Sacarose	99,30	397,20	0	99,30	0
Celulose	10,00	0	0	0	0
Óleo de soja	38,89	350,01	0	0	38,89
Mistura Mineral	8,75	7,36	0	1,84	0
Mistura Vitamínica	2,50	9,76	0	2,44	0
Cloreto de Colina (0,2%)	0,25	0	0	0	0
Sorbato de potássio	3,50	0	0	0	0
Etanol	0	0	0	0	0
TOTAL		1000,09	45,00	117,52	38,89
Porcentagem do VCT			18,00%	47,00%	35,00%

Kcal: quilocalorias; PTN: proteína; CHO: carboidrato; LIP: lipídeo; VCT: valor calórico total.

Mistura Mineral (0,84Kcal/g): 8,75g/L de dieta: 7,35Kcal referentes à mistura mineral/L de dieta.

Mistura Vitamínica (3,9Kcal/g): 2,5g/L de dieta: 9,75Kcal referentes à mistura vitamínica/L de dieta.

2,5g mix vit./1L de dieta = 0,0375g ou 37,5mg vit E/1L de dieta

2,5g mix vit. suplementada/1L de dieta = 750mg vit E/1L de dieta

Tabela 3. Características da dieta dos Grupos 2 e 3 (gramas/litro de dieta).

Ingredientes	g/L	Kcal	Etanol	PTN (g)	CHO (g)	LIP (g)
Amido de Milho	16,00	56,16	0	0,10	13,94	0
Caseína (equivalente a 89,57%de proteína)	49,23	176,40	0	44,10	0	0
Cistina	0,50	2,00	0	0,50	0	0
Metionina	0,30	1,20	0	0,30	0	0
Sacarose	10,53	42,12	0	0	10,53	0
Celulose	10,00	0	0	0	0	0
Óleo de soja	38,89	350,01	0	0	0	38,89
Mistura Mineral	8,75	7,36	0	0	1,84	0
Mistura Vitamínica	2,50	9,76	0	0	2,44	0
Cloreto de Colina (0,2%)	0,25	0	0	0	0	0
Sorbato de potássio	3,50	0	0	0	0	0
Etanol	50,00	355,00	50,00	0	0	0
TOTAL		1000,01	50,00	45,00	28,75	38,89
Porcentagem do VCT			35,50%	18,00%	11,50%	35,00%

Kcal: quilocalorias; PTN: proteína; CHO: carboidrato; LIP: lipídeo; VCT: valor calórico total.

Tabela 4. Teor de vitamina E nas dietas líquidas nos diferentes Grupos (miligramas/litro de dieta).

Ingredientes	G1 / G2 / G3	Alfa-tocoferol (mg/L)		
		G1	G2	G3
Amido de Milho	16,00	0	0	0
Caseína (equivalente a 89,57%de proteína)	49,23	0	0	0
Cistina	0,50	0	0	0
Metionina	0,30	0	0	0
Sacarose	individual	0	0	0
Celulose	10,00	0	0	0
Óleo de soja	38,89	8,38	8,38	8,38
Mistura Mineral	8,75	0	0	0
Mistura Vitamínica	2,50 (G1 e G2)	37,50	37,50	0
Mistura Vitamínica Suplementada 20x com vit E	2,50 (G3)	0	0	750,00
Cloreto de Colina (0,2%)	0,25	0	0	0
Sorbato de potássio	3,50	0	0	0
Etanol	50,00 (G2 e G3)	0	0	0
SUBTOTAL		45,88	45,88	758,38

G1: Controle sem tratamento; G2: Pancreatite alcoólica crônica; G3: Pancreatite alcoólica crônica + Vitamina E.

Os animais passaram por um período de três dias de adaptação ao ambiente, recebendo ração do biotério, e um período de uma semana de adaptação às suas respectivas dietas, quando o etanol foi gradativamente introduzido na dieta dos Grupos 2 e 3 na seguinte proporção: do primeiro ao terceiro dia, a dieta continha 10,0% do VCT de etanol; do quarto ao sexto, 25,0%; e a partir do sétimo dia e até o final da sexta semana do período experimental, 35,5%.

O volume de dieta oferecido foi baseado nos grupos pareados (*pair-fed*), sendo que o volume ingerido por cada animal do Grupo 2 foi o volume oferecido para os respectivos animais dos Grupos 1 e 3 no dia seguinte.

Durante todo o período experimental, os animais foram pesados semanalmente e a ingestão dietética medida diariamente. As condições de temperatura (25°C) e o ciclo claro-escuro de 12 horas foram mantidos.

A partir do início da quinta semana do período experimental, os ratos que recebiam a dieta contendo etanol, ou seja, dos Grupos 2 e 3, receberam ciclosporina A (Sandimmun® – Novartis) (CsA) na dose de 20 mg/kg uma vez ao dia, via subcutânea, durante as duas últimas semanas do período experimental. Após uma semana do início da CsA, ou seja, no primeiro dia da última semana, a pancreatite foi induzida por meio de quatro injeções, com intervalo de 1 hora, de ceruleína (Sigma–Aldrich®) (Cer) na dose de 20 µg/kg, nos Grupos 2 e 3, via intraperitoneal.

Ao término das seis semanas do período experimental, todos os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação, de forma que as análises correspondem ao momento de uma semana após a indução da injúria pancreática. O pâncreas foi destinado à análise histopatológica e extração do RNA total para análise da expressão gênica; o fígado destinado à determinação hepática de α -tocoferol e lipídeos totais, e análise histopatológica; e o plasma para determinação

de α -tocoferol. O fígado foi lavado em solução salina, pesado, envolvido em papel alumínio, colocado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C para posteriores análises. O pâncreas, destinado à extração de RNA, foi estocado em RNAlater[®] (Qiagen) para estabilização do RNA. As amostras de sangue foram coletadas em tubos plásticos estéreis, contendo EDTA. O sangue total foi processado no prazo de duas horas, sob refrigeração, tendo sido centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm, à temperatura ambiente, para separação do plasma, o qual foi armazenado a -80°C. Os fragmentos de pâncreas e fígado destinados às análises histopatológicas foram cortados em formato retangular, e acondicionados em solução de formol tamponado suficiente para fixação do tecido, até posterior processamento e montagem de lâminas. O delineamento experimental está representado na Figura 1.

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, protocolo de número 005/2009, em 16 de fevereiro de 2009 (ANEXO).

Figura 1. Delineamento experimental: G1: Grupo Controle; G2: Grupo Pancreatite Alcoólica Crônica (PAC); G3: Grupo PAC e suplementado 20x com α -tocoferol; Rb: ração biotério; Dc: dieta controle; Dx: dieta com etanol e 20x α -tocoferol; Dy: dieta com etanol e 20x α -tocoferol; π : pesagens dos animais (semanalmente); CsA: ciclosporina A; Cer: ceruleína. *As drogas ciclosporina A e ceruleína foram injetadas apenas nos Grupos 2 e 3.

3.2. Análise histopatológica

3.2.1. Pâncreas

Fragmentos de tecido pancreático foram fixados em solução de formol tamponado 4%, seccionados em micrômetro (Microm ®) com 4 µm de espessura e corados com HE (Hematoxilina de Harris e Eosina), e examinados com auxílio de um microscópio binocular (*Carl Zeiss, Axiostar, Alemanha*) com aumento de 400x, com a finalidade de verificar a ocorrência de pancreatite nos Grupos 2 e 3.

Uma vez confirmada a pancreatite, foi caracterizada como tipo crônico pela presença de destruição tecidual focal e de infiltrado inflamatório de células mononucleares.

3.2.2. Fígado

Para confirmação de adequada reprodução do modelo experimental de alcoolismo crônico de Lieber e DeCarli (1989), investigou-se a presença de esteatose hepática e correspondente comportamento a partir da concomitante indução de pancreatite alcoólica crônica, por meio da análise histopatológica do fígado como ferramenta secundária.

Fragmentos de tecido hepático foram fixados em solução de formol tamponado 4%, seccionados em micrômetro (Microm ®) com 4 µm de espessura e corados com HE (Hematoxilina de Harris e Eosina), e examinados com auxílio de um microscópio binocular (*Carl Zeiss, Axiostar, Alemanha*) com aumento de 400x, com a finalidade de avaliar semi-quantitativamente a esteatose. As lâminas histológicas foram analisadas conforme o grau de esteatose hepática, segundo Oliveira e cols. (2009). O grau de esteatose no tecido hepático (porcentagem de células hepáticas

contendo gordura) foi classificado como: <30% correspondente a leve; 30-60%, moderada; >60%, grave.

3.3. Determinação de vitamina E (α -tocoferol)

As concentrações hepática e plasmática de α -tocoferol foram determinadas por meio de método adaptado de Arnaud e cols. (1991), por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para isto, foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu (*Japan*), modelo LC10AT, coluna tipo C18 (Agilent Zorbax ODS; 5 μ m; 4,6 x 150 mm), acoplado a um detector UV-visível SPD-10A, com detecção em 292 nm e velocidade de fluxo de 1,0 mL/min. Como fase móvel, utilizou-se uma mistura de acetonitrila:diclorometano:metanol na proporção de 7:2:1.

3.3.1. Determinação plasmática de α -tocoferol

A 300 μ L de plasma contidos em um tubo de ensaio, foram adicionados 600 μ L de etanol absoluto, agitando-se por 1 minuto. Em seguida, acrescentou-se 600 μ L de N-hexano, com posterior agitação por 1 minuto. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3.000 rpm, retirando-se uma alíquota de 300 μ L da fase orgânica. Esta alíquota foi seca em fluxo de $N_{2(g)}$ e suspensa em 300 μ L de fase móvel, dos quais 20 μ L foram injetados no sistema de CLAE. As concentrações de α -tocoferol foram calculadas utilizando-se uma curva de calibração construída por meio de padrão externo de α -tocoferol (Sigma), sendo os resultados expressos em μ mol/L plasma.

3.3.2. Determinação hepática de α -tocoferol

Amostras de fígado de aproximadamente 200 mg foram maceradas com 1 mL de etanol absoluto com o auxílio de um Potter. Em seguida, foi acrescentado 1 mL

de N-hexano ao homogenato, agitando-se por aproximadamente 1 minuto. Este passo foi repetido mais duas vezes, com posterior reunião das fases hexânicas. Foi retirada uma alíquota de 300 μL , que foi seca em fluxo de $\text{N}_{2(g)}$ e, posteriormente, suspensa em 300 μL de fase móvel, dos quais 20 μL foram injetados no sistema de CLAE. As concentrações de α -tocoferol foram calculadas utilizando-se uma curva de calibração construída por meio de padrão externo de α -tocoferol (Sigma), sendo os resultados expressos em nmols/g fígado e nmols/mg lipídeo total hepático.

3.4. Determinação hepática de lipídeos totais

A extração da gordura total foi realizada por meio do método gravimétrico como descrito previamente por Folch e cols. (1957), a partir de 1g de tecido hepático dos animais dos diferentes grupos, utilizando-se clorofórmio:metanol na proporção de 2:1, em quantidade suficiente para 20 mL. O homogeneizado foi filtrado em papel de filtro, sendo que a cada 10 mL do filtrado eram adicionados 2 mL de solução salina 0,9%. Para a separação das fases clorofórmica e aquosa, o material foi deixado em repouso noturno. A fase aquosa (fase superior) foi desprezada, e uma alíquota da fase clorofórmica foi transferida para tubos previamente pesados, para posterior evaporação a 50°C. A quantidade de gordura na alíquota foi obtida pela diferença entre os pesos final e inicial.

3.5. Extração de RNA total

Tão logo ocorreu a eutanásia, o tecido pancreático foi imediatamente retirado e armazenado em solução estabilizadora de RNA (RNA later® - Qiagen) a 4°C por um mínimo de 24 horas e máximo de 30 dias, para posterior extração do RNA total. O RNA total foi extraído a partir de 10 mg de tecido pancreático de ratos dos

diferentes grupos em estudo, utilizando-se o método de extração fenol-clorofórmio descrito por Chomczynski e Sacchi (1987), a partir de 1,0 mL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) conforme as recomendações do fabricante.

A integridade do RNA total foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro (Thermo scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer), medindo-se a absorbância em contraste com uma amostra de água, nos comprimentos de onda de 260, 280 e 230 nm, para avaliação do grau de pureza. A concentração de RNA total é dada em ng/μL, onde uma unidade de densidade óptica (DO) equivale a 40 μg de RNA por mL de solução. Para a análise de expressão gênica em PCR quantitativo em tempo real (reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real), foram considerados os RNAs cujas razões de absorbância 260/280 encontravam-se na faixa de 1,8 a 2,1, ou seja, livres da contaminação com proteína ou DNA.

As amostras de RNA total extraído foram armazenadas em freezer a -80°C, em alíquotas, para garantir a estabilidade e preservação do RNA, evitando-se a degradação do material devido à manipulação e à variação de temperatura.

3.6. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

O cDNA foi sintetizado por meio de transcrição reversa a partir de 2μg de RNA total do pâncreas de ratos dos diferentes grupos de estudo, na presença de transcriptase reversa e do iniciador oligo (dt), conforme instruções do fabricante (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, ABI), e com a adição de um inibidor de Rnase (Rnasin, Promega, Madison, EUA).

Para análise da expressão gênica dos transcritos que codificam para os marcadores inflamatórios (α-SMA, Colágeno, COX-2, IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10,

MCP-1, MIF, MIP-3 α , MMP-2, MMP-9, Pap, TNF- α), foram idealizados oligonucleotídeos iniciadores específicos visando a amplificação de toda a matriz de leitura aberta (ORF - Open Reading Frame).

As reações de PCR qualitativa, cujas condições de termociclagem compreenderam uma incubação à 95°C por 3 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, e 72°C por 6 minutos, foram feitas a partir de 1,0 μ L de cDNA do Grupo 1 (Controle) (para o TNF- α , utilizou-se 1,0 μ L do Grupo 2), sendo os produtos purificados e analisados em gel de agarose 1,5%. A partir do produto purificado de PCR, fez-se os posteriores ensaios de curva-padrão para RT-qPCR (*Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction*).

As reações de RT-qPCR foram realizadas pelo método SYBR Green, em um aparelho ABI Prism 7500 (Applied Biosystems), utilizando-se o método de “quantificação relativa”. Os níveis relativos de transcritos foram determinados utilizando-se 18S RNA ribossômico (18S rRNA) como gene de controle endógeno. As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50°C por 2 minutos, seguida pela ativação da DNA polimerase a 95°C por 10 minutos, e 40 a 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos intercalados com anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. As reações foram preparadas em duplicatas, com coeficiente de variação máximo permitido de 2%, e para um volume final de 10 μ L.

Foram feitos ensaios para curva-padrão para cada transcrito, no intuito de definir o valor do “threshold” (limiar de detecção) para que cada reação apresentasse eficiência em torno de 100%, além de otimização das quantidades de *primer* e de cDNA a serem utilizadas nas reações de quantificação relativa dos respectivos transcritos. Para o cálculo da quantidade relativa (*Fold Change*), foi aplicado o

método DDCT a fim de se realizar comparação relativa ao grupo que não recebeu tratamento, ou seja, o grupo calibrador. Neste estudo, os calibradores foram o Grupo 1, o qual não recebeu tratamento com etanol e drogas indutoras de pancreatite, e o Grupo 2, o qual não recebeu suplementação com vitamina E na presença de pancreatite.

Os resultados foram apresentados da seguinte forma:

Grupo 1 calibrador:

- G2/G1 representa o número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso no Grupo 2 em relação ao Grupo 1, a fim de se avaliar se a pancreatite alcoólica crônica altera a expressão dos genes em estudo.
- G3/G1 representa o número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso no Grupo 3 em relação ao Grupo 1, a fim de se avaliar se a pancreatite alcoólica crônica concomitante à suplementação com vitamina E alteram a expressão dos genes em estudo.

Grupo 2 calibrador:

- G3/G2: representa o número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso no Grupo 3 em relação ao Grupo 2, a fim de se avaliar se a suplementação com vitamina E altera a expressão dos genes em estudo, na condição de pancreatite alcoólica crônica.

3.7. Análise estatística

As diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando a análise de variância para fator único (one way ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey, com o auxílio do *software* SAS® 9.1, através do PROC IML. Para admitir diferenças estatisticamente significativas foi considerado $p < 0,05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Ingestão de dieta

Ao final das seis semanas de experimento, totalizando sete semanas contando-se o período de adaptação à dieta com etanol, houve duas mortes no Grupo 2 (dieta com etanol) e uma morte no Grupo 3 (dieta com etanol e suplementada com vitamina E), resultando em um n de 6, 8 e 9 animais para os Grupos 1, 2 e 3 respectivamente.

A Figura 2 contém a curva média de ingestão diária da dieta líquida nos três diferentes grupos, nos sete primeiros dias de adaptação e nos 42 dias seguintes de experimento. Não houve diferença na ingestão total e diária de dieta líquida entre os três grupos, bem como na ingestão total e diária de etanol entre os Grupos 2 e 3 ($p>0,05$), mesmo quando os valores foram normalizados por grama de peso corporal. Houve maior ingestão de vitamina E total e diária pelo Grupo 3 em relação aos Grupos 1 e 2 ($p<0,01$), comprovando a suplementação daquele (Figura 3, Tabela 5).

Figura 2. Ingestão diária média de dieta líquida (mL) nos grupos (G1: Controle sem tratamento, G2: Pancreatite alcoólica crônica, G3: Pancreatite alcoólica crônica + Vitamina E) durante período experimental. Os valores estão representados como média (erro padrão da média). N amostral: G1: 6 animais; G2: 8 animais; G3: 9 animais. *Pair-fed* dos animais de G1 e G3 com G2. Para admitir diferenças estatisticamente significativas foi considerado $p<0,05$. $P>0,05$ comparando-se todos os grupos (ANOVA).

Figura 3. Consumo total de (A): dieta líquida (mL/g); (B): α -tocoferol (mg/g) e (C): etanol (mL/g) nos grupos (G1: Controle sem tratamento, G2: Pancreatite alcoólica crônica, G3: Pancreatite alcoólica crônica + Vitamina E) normalizado por grama de peso corporal (Pcorporal). Os valores estão representados como média (erro padrão da média). N amostral: G1: 6 animais; G2: 8 animais; G3: 9 animais. *Pair-fed* dos animais de G1 e G3 com G2. Para admitir diferenças estatisticamente significativas foi considerado $p < 0,05$. * $p < 0,01$ em relação a G1 e G2 (ANOVA).

Tabela 5. Ingestão Total, Diária e normalizada por grama de Peso corporal (P_{corp}) de dieta líquida (mL), alfa-tocoferol (mg) e etanol (mL) nos grupos (G1: sem tratamento, G2: dieta com etanol, G3: dieta com etanol + vitamina E) durante período experimental.

	G1	G2	G3
Dieta líquida			
Total (mL)	3196,83 (78,4)	3153,75 (136,4)	3106,44 (89,4)
Diária (mL)	66,60 (1,6)	65,70 (2,8)	64,72 (1,9)
Total/ P_{corp} (mL/g)	12,3 (0,55)	13,4 (1,00)	13,8 (1,81)
α-tocoferol			
Total (mg)	146,67 (0,4)	144,69 (0,5)	2355,86 (7,5)*
Diária (mg)	3,06 (0,4)	3,01 (0,5)	49,08 (7,5)*
Total/ P_{corp} (mg/g)	0,6 (0,03)	0,6 (0,05)	10,5 (1,37)*
Etanol			
Total (mL)	-	157,69 (0,5)	155,32 (0,5)
Diária (mL)	-	3,29 (0,5)	3,24 (0,5)
Total/ P_{corp} (mL/g)	-	0,67 (0,05)	0,69 (0,09)

Os valores estão representados como média (erro padrão da média). N amostral: G1: 6 animais; G2: 8 animais; G3: 9 animais. *Pair-fed* dos animais de G1 e G3 com G2. Para admitir diferenças estatisticamente significativas foi considerado $p < 0,05$. * $p < 0,01$ em relação a G1 e G2 (ANOVA).

4.2. Variação do peso corporal

A média do peso corporal semanal dos três grupos está representada na Figura 4.

Figura 4. Ganho de peso médio (gramas) dos animais por semana (G1: Controle sem tratamento, G2: Pancreatite alcoólica crônica, G3: Pancreatite alcoólica crônica + Vitamina E) durante período experimental. Os valores estão representados como média (erro padrão da média). N amostral: G1: 6 animais; G2: 8 animais; G3: 9 animais. *Pair-fed* dos animais de G1 e G3 com G2. Para admitir diferenças estatisticamente significativas foi considerado $p < 0,05$. $P > 0,05$ comparando-se todos os grupos (ANOVA).

Não houve diferença na média de evolução do peso corporal dos animais ao longo de todo o período experimental ($p>0,05$), bem como no ganho total de peso corporal ao final da sexta semana de tratamento (Ganho de peso total: Grupo 1: $122,7 \pm 10,8$ g; Grupo 2: $114,5 \pm 19,1$ g; Grupo 3: $111,0 \pm 9,9$ g), conforme mostrado na Figura 5 ($p>0,05$).

Figura 5. Ganho de peso corporal total (gramas) dos animais nos grupos (G1: Controle sem tratamento, G2: Pancreatite alcoólica crônica, G3: Pancreatite alcoólica crônica + Vitamina E) durante período experimental. Os valores estão representados como média (erro padrão da média). N amostral: G1: 6 animais; G2: 8 animais; G3: 9 animais. *Pair-fed* dos animais de G1 e G3 com G2. Para admitir diferenças estatisticamente significativas foi considerado $p<0,05$. $P>0,05$ comparando-se todos os grupos (ANOVA).

4.3. Análise histopatológica

4.3.1. Pâncreas

O pâncreas dos animais do Grupo 1, ou seja, os que não receberam a dieta contendo etanol, mostram histologia normal. Já nos Grupos 2 e 3, nos quais houve a indução da pancreatite alcoólica crônica, houve focos de destruição tecidual leve a moderada, presença de infiltrado de células mononucleares (entre os quais linfócito e plasmócito) e proliferação de tecido conjuntivo. Houve confirmação da lesão ainda em estágios iniciais de pancreatite alcoólica crônica, particularmente na parte exócrina do pâncreas, conforme mostra a Figura 6.

A

B

C

Figura 6. Análise histopatológica do tecido pancreático. (A): Grupo 1 (Controle): parênquima pancreático normal, x200. (B): Grupo 2 (Pancreatite alcoólica crônica): inflamação crônica focal, x400. (C): Grupo 3 (Pancreatite alcoólica crônica + Vitamina E): inflamação crônica focal, x400. Coloração HE (hematoxilina e eosina), microscopia de luz convencional. Letras nas figuras: A: ácinos pancreáticos; DT: região de destruição tecidual focal; ILH: Ilhotas de Langerhans; IM: infiltrado inflamatório mononuclear; L: linfócito; P: plasmócito.

4.3.2. Fígado

O fígado dos animais do Grupo 1, os que não receberam a dieta contendo etanol, apresentou histologia normal. Já os Grupos 2 e 3, os quais receberam etanol, desenvolveram esteatose macro e microvesicular em grau moderado e bastante variável entre os animais, de cerca de 30 a 60%, utilizando-se o método de dez campos visuais com lente no aumento de 250x, conforme mostra a Figura 7.

A

B

C

Figura 7. Análise histopatológica do tecido hepático. (A): Grupo 1 (Controle): parênquima hepático normal, x200. (B): Grupo 2 (Pancreatite alcoólica crônica): parênquima hepático com esteatose macro e microvesicular (60%), x200. (C): Grupo 3 (Pancreatite alcoólica crônica + Vitamina E): parênquima hepático com esteatose macro e microvesicular (50%), x200. Coloração HE (hematoxilina e eosina), microscopia de luz convencional

O peso médio total do fígado, apresentado na Tabela 6, apresentou diferença significativa para o Grupo 1 (Controle) em relação aos Grupos 2 e 3 (que receberam etanol), apresentando um peso maior naquele ($p < 0,01$). Contudo, conforme mostra a Figura 8, quando avaliado o índice do peso do fígado/peso corpóreo nos grupos (Peso do fígado em gramas/100 gramas de Peso corporal), não houve diferença entre os três grupos ($p > 0,05$).

Tabela 6. Peso corporal (gramas), peso do fígado (gramas) e peso relativo do fígado (gramas/100 gramas de peso corporal dos animais), após período experimental. G1: Controle sem tratamento, G2: Pancreatite alcoólica crônica, G3: Pancreatite alcoólica crônica + Vitamina E.

	G1	G2	G3
Peso corporal (g)	259,5 (9,9)	237,1 (25,9)	228,0 (28,7)
Peso do fígado (g)	10,61 (0,59)*	8,64 (1,52)	8,66 (1,28)
Peso relativo do fígado (g/100g P_{corporal})	4,1 (0,3)	3,6 (0,4)	3,8 (0,3)

Os valores estão representados como média (erro padrão da média). N amostral: G1: 6 animais; G2: 8 animais; G3: 9 animais. *Pair-fed* dos animais de G1 e G3 com G2. Para admitir diferenças estatisticamente significativas foi considerado $p < 0,05$. * $p < 0,01$ em relação a G2 e G3 (ANOVA).

Figura 8. Peso relativo do fígado (g/100g de peso corporal) dos animais (G1: Controle sem tratamento, G2: Pancreatite alcoólica crônica, G3: Pancreatite alcoólica crônica + Vitamina E) após 6 semanas de tratamento. Os valores estão representados como média (erro padrão da média). N amostral: G1: 6 animais; G2: 8 animais; G3: 9 animais. *Pair-fed* dos animais de G1 e G3 com G2. Para admitir diferenças estatisticamente significativas foi considerado $p < 0,05$. $P > 0,05$ comparando-se todos os grupos (ANOVA).

4.4. Níveis plasmáticos e hepáticos de α -tocoferol

Os níveis tanto plasmáticos quanto hepáticos de α -tocoferol foram maiores no grupo que recebeu suplementação com vitamina E, ou seja, no Grupo 3 em relação aos Grupos 1 e 2 ($p<0,01$), como mostram as Figuras 9 e 10A. A relação dos níveis hepáticos de α -tocoferol por miligrama de lipídeo total hepático também foi maior no Grupo 3 (Figura 10B) ($p<0,01$) [(G1: $14,27 \pm 1,5$ $\mu\text{mols/L}$ plasma; $125,47 \pm 18,5$ nmols/g fígado; $5,1 \pm 0,8$ nmols/mg lipídeo); (G2: $21,64 \pm 3,0$ $\mu\text{mols/L}$ plasma; $126,54 \pm 10,5$ nmols/g fígado; $2,8 \pm 0,7$ nmols/mg lipídeo); (G3: $43,91 \pm 6,1$ $\mu\text{mols/L}$ plasma*; $1595,90 \pm 802,7$ nmols/g fígado*; $17,3 \pm 8,8$ nmols/mg lipídeo*)].

Figura 9. Níveis plasmáticos de α -tocoferol nos animais ($\mu\text{mols/L}$ plasma) (G1: Controle sem tratamento, G2: Pancreatite alcoólica crônica, G3: Pancreatite alcoólica crônica + Vitamina E), após 6 semanas de tratamento. Os valores estão representados como média (erro padrão da média). N amostral: G1: 6 animais; G2: 8 animais; G3: 9 animais. *Pair-fed* dos animais de G1 e G3 com G2. Para admitir diferenças estatisticamente significativas foi considerado $p<0,05$. * $p<0,01$ em relação a G1 e G2 (ANOVA).

A **B**

Figura 10. Níveis hepáticos de α -tocoferol nos animais (A): nmols/g tecido hepático e (B): nmols/mg lipídeos totais hepáticos (G1: Controle sem tratamento, G2: Pancreatite alcoólica crônica, G3: Pancreatite alcoólica crônica + Vitamina E), após 6 semanas de tratamento. Os valores estão representados como média (erro padrão da média). N amostral: G1: 6 animais; G2: 8 animais; G3: 9 animais. *Pair-fed* dos animais de G1 e G3 com G2. Para admitir diferenças estatisticamente significativas foi considerado $p < 0,05$. * $p < 0,01$ em relação a G1 e G2 (ANOVA).

4.5. Níveis hepáticos de lipídeos totais

Os níveis hepáticos de lipídeos totais foram maiores no grupo que recebeu suplementação com vitamina E, ou seja, no Grupo 3 em relação aos Grupos 1 e 2 ($p < 0,01$), como mostra a Figura 11 (G1: $2,49 \pm 0,5$ %; G2: $4,78 \pm 1,3$ %; G3: $9,82 \pm 3,1$ %*).

Figura 11. Conteúdo de lipídeos totais (% ou g lipídeos/100g de tecido hepático) no tecido hepático dos animais (G1: Controle sem tratamento, G2: Pancreatite alcoólica crônica, G3: Pancreatite alcoólica crônica + Vitamina E) após 6 semanas de tratamento. Os valores estão representados como média (erro padrão da média). N amostral: G1: 6 animais; G2: 8 animais; G3: 9 animais. *Pair-fed* dos animais de G1 e G3 com G2. Para admitir diferenças estatisticamente significativas foi considerado $p < 0,05$. * $p < 0,01$ em relação a G1 e G2 (ANOVA).

4.6. Expressão gênica

Para análise da expressão gênica dos transcritos que codificam para α -SMA (*Acta2 smooth muscle alpha-actin*), colágeno (*Col1a1 collagen, type I, alpha 1*), ciclooxigenase (COX-2; *Ptgs2 prostaglandin-endoperoxide synthase 2*), interleucinas 1, 4, 6, 8 e 10 (*Il1a interleukin 1 alpha*; *Il4 interleukin 4*; *Il6 interleukin 6*; *Il8 interleukin 8*; *Il10 interleukin 10*), MCP-1 [*Ccl2 chemokine (C-C motif) ligand 2*], Mif (*Mif macrophage migration inhibitory factor*), MIP-3 α (*Ccl20 chemokine (C-C motif) ligand 20*), metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2: *Mmp2 matrix metalloproteinase 2*; MMP-9: *Mmp9 matrix metalloproteinase 9*), Pap (*Pap pancreatitis-associated protein*; terminologia atual: *Reg3b regenerating islet-derived 3 beta*) e TNF- α [*Tnf tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)*], e para o gene constitutivo 18S (*18S Ribosomal RNA*), foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores específicos descritos na Tabela 7. Estes oligonucleotídeos iniciadores foram idealizados com base em seqüências de cDNAs, obtidas do banco genômico do rato (Rat Genome

Database - <http://rgd.mcw.edu/>), visando a amplificação de toda a matriz de leitura aberta dos genes codificadores desses 15 genes descritos.

Tabela 7. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores usados na amplificação por PCR.

Nome do gene	Nº de acesso no GenBank	Oligonucleotídeos Iniciadores	Produto esperado (pb)	Temperatura de Anelamento (°C)
α -SMA	NM_031004.2	S: AGGGAGTGATGGTTGGAATG AS: GATGATGCCGTGTTCTATCG	107	59
Col1a1	NM_053304.1	S: TTCGAGTATGGAAGCGAAGG AS: TTGAGGTTGCCAGTCTGTTG	149	60
COX-2	NM_017232.2	S: CCAGTATCAGAACCGCATTG AS: TGAGCAAGTCCGTGTTCAAG	150	60
IL-1	NM_017019.1	S: GCCCTTTACTGAAGATGACCTG AS: TGATGAACTCCTGCTTGACG	134	60
IL-4	NM_201270.1	S: ATCCACGGATGTAACGACAG AS: GCATGGAGTCCCTTTTTCTG	78	59
IL-6	NM_012589.1	S: GATGGATGCTTCCAACTGG AS: AAACGGAACTCCAGAAGACC	77	59
IL-8	NM_017183.1	S: TGGTGATGCTGGTCATCTTG AS: TTTAGATGCAGCCAGACAG	122	60
IL-10	NM_012854.1	S: TGGAGTGAAGACCAGCAAAG AS: TCCAGCTGGTCCTTCTTTTG	144	60
MCP-1	NM_031530.1	S: CACTATGCAGGTCTCTGTACAG AS: GATCTCACTTGGTTCTGGTCCA	294	61
Mif	NM_031051.1	S: GCCCAGAACCGCAACTACAG AS: GTGCAGCAAGACTCGAAGAAC	186	62
MIP-3 α	NM_019233.1	S: GCAAGCAACTTTGACTGCTG AS: CGGATCTTTTCGACTTCAGG	142	60
MMP-2	NM_031054.1	S: AGTGGATGATGCCTTTGCTC AS: ATGATGTCAGCTTCCCCATC	93	60
MMP-9	NM_031055.1	S: TGAAAACCTCCAACCTCACG AS: TGCTTCTCTCCCATCATCTG	94	60
Pap	NM_053289.1	S: CTGGTTTGATGCAGAACTGG AS: GTGTTCTTGACCATGGATGC	105	59
TNF- α	NM_012675.2	S: TCTTCTCATTCTGCTCGTG AS: TTGGGAATTCTCCTCCTTG	93	59
18S	X01117	S: GAGCGGTCGGCGTCCCCCAAC AS: GCGCGTGCAGCCCCGGACATC	107	63

S: *sense (forward primer)*; AS: *antisense (reverse primer)*; α -SMA: *smooth muscle alpha-actin*; Col1a1: colágeno; COX-2: ciclooxigenase 2; IL: interleucinas 1, 4, 6, 8 e 10; MCP-1: quimioatração de células mononucleares; Mif: fator de inibição da migração de macrófagos; MIP-3 α : quimioatração de células mononucleares; MMP: metaloproteinases 2 e 9; Pap: *pancreatitis-associated protein*; TNF- α : fator de necrose tumoral α ; 18S: RNA 18S ribossomal.

De todos os 15 genes, apenas 2 não apresentaram amplificação no tecido pancreático em nenhum dos três grupos de estudo, que foram a interleucina 1 (IL-1) e a metaloproteinase 9 (MMP-9), conforme avaliado em gel do produto purificado de

PCR (qualitativo) na Figura 12. Apenas 1 gene, o TNF- α , não apresentou amplificação somente no Grupo 1 (Controle), portanto, neste caso, o Grupo 2 foi utilizado como grupo calibrador para as análises de RT-qPCR.

A

B

Figura 12. Gel do produto purificado de PCR (qualitativo) dos genes de estudo. (A): α -SMA: *smooth muscle alpha-actin*; Col1a1: colágeno; COX-2: ciclooxigenase 2; IL: interleucinas 1, 4, 6, 8 e 10; MCP-1: quimioatração de células mononucleares; Mif: fator de inibição da migração de macrófagos; MIP-3 α : quimioatração de células mononucleares. (B): MMP: metaloproteinases 2 e 9; Pap: *pancreatitis-associated protein*; TNF- α : fator de necrose tumoral α ; 18S: RNA 18S ribossomal. Padrão 100 pb: Padrão de peso molecular de 100 pares de bases. Não houve amplificação para IL-1 e MMP-9. Para TNF- α , foi utilizado cDNA do Grupo 2 (Pancreatite alcoólica crônica), para os outros genes, cDNA do Grupo 1 (Controle).

A Tabela 8 contém os resultados dos ensaios para otimização dos *primers*, assim como da quantidade ótima de cDNA que foram utilizados nas reações de

quantificação relativa dos respectivos transcritos, além do valor do “threshold” (limiar de detecção) definido pela análise das curvas-padrão para cada transcrito, considerando-se eficiência em torno de 100%. Para o cálculo da quantidade relativa (*Fold Change*), foi aplicado o método DDCT a fim de se realizar comparação relativa ao grupo não tratado (calibrador), neste trabalho, o Grupo 1. Além disso, para o Grupo 3, também foi realizada a análise relativa ao Grupo 2, com a finalidade de se detectar diferenças relacionadas especificamente à suplementação com vitamina E, na presença de pancreatite alcoólica crônica.

Tabela 8. Threshold, quantidades de primer e de cDNA e condições de termociclagem padronizadas para cada um dos oligonucleotídeos iniciadores a partir dos ensaios de curva-padrão e de otimização, para amplificação por RT-qPCR.

Nome do gene	Threshold	Quantidade de primer (nM)	Quantidade de cDNA (ng)	Nº de ciclos de desnaturação
α -SMA	0,0149932	150	1000	40
Col1a1	0,0339413	100	1000	40
COX-2	0,0669473	150	1000	45
IL-1	Não houve amplificação			
IL-4	0,0038001	150	1000	45
IL-6	0,0156609	100	1500	45
IL-8	0,0431697	100	1500	45
IL-10	0,0185680	150	1500	45
MCP-1	0,0152770	100	1500	45
Mif	0,0483102	150	1000	40
MIP-3 α	0,0073526	150	1000	40
MMP-2	0,1242980	150	1000	40
MMP-9	Não houve amplificação			
Pap	0,1041760	150	1000	40
TNF- α	0,0084788	100	1000	45
18S	0,3996700	100	-	-

Threshold: limiar de detecção; RT-qPCR: (*Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction*); α -SMA: *smooth muscle alpha-actin*; Col1a1: colágeno; COX-2: ciclooxigenase 2; IL: interleucinas 1, 4, 6, 8 e 10; MCP-1: quimioatração de células mononucleares; Mif: fator de inibição da migração de macrófagos; MIP-3 α : quimioatração de células mononucleares; MMP: metaloproteinases 2 e 9; Pap: *pancreatitis-associated protein*; TNF- α : fator de necrose tumoral α ; 18S: RNA 18S ribossomal.

A quantificação relativa, apresentada na Tabela 9, mostrou que a pancreatite alcoólica crônica (PAC), tanto no Grupo 2 quanto no Grupo 3, ou seja, independente

da suplementação com vitamina E, levou ao aumento significativo da expressão gênica de todos os genes biomarcadores do processo inflamatório, quando comparados ao Grupo Controle (Grupo 1), com exceção de IL-1, MMP-9 e TNF- α , os quais não obtiveram amplificação no Grupo 1 ($p < 0,01$).

A suplementação com vitamina E na presença de PAC, ou seja, no Grupo 3, em relação ao grupo com PAC que não recebeu a suplementação (Grupo 2), diminuiu o número de transcritos para os genes α -SMA, COX-2, IL-6, MIP-3 α , TNF- α ($p < 0,01$), aumentou o número de transcritos para Pap ($p < 0,01$) e não modificou significativamente a expressão gênica no tecido pancreático de Col1a1, IL-4, IL-8 e IL-10, MCP-1, Mif, MMP-2 ($p > 0,05$) (Tabela 9).

Tabela 9. Quantidade relativa dos transcritos em estudo, após amplificação por RT-qPCR.

Nome do gene	G1	G2/G1	G3/G1	G3/G2
α -SMA	1	25,5 (12,3)*	12,8 (5,4)*	-2,2 (1,0)*
Col1a1	1	32,9 (15,3)*	18,2 (7,5)*	-1,8 (1,1)
COX-2	1	12,2 (3,7)*	3,7 (1,1)*	-3,5 (1,1)*
IL-4	1	9,8 (3,6)*	10,3 (0,4)*	1,1 (0,4)
IL-6	1	15,6 (5,0)*	7,5 (4,4)*	-2,5 (1,2)*
IL-8	1	13,0 (7,1)*	9,1 (4,1)*	-1,0 (1,7)
IL-10	1	470,1 (145,2)*	794,0 (275,4)*	1,5 (1,4)
MCP-1	1	14,8 (1,8)*	9,7 (2,7)*	-1,7 (0,6)
Mif	1	4,5 (1,2)*	4,3 (1,5)*	-0,4 (1,4)
MIP-3 α	1	12,9 (5,3)*	6,1 (2,7)*	-2,2 (1,2)*
MMP-2	1	10,0 (2,6)*	6,0 (1,5)*	-1,7 (0,5)
Pap	1	92,4 (17,7)*	409,7 (170,9)*	4,5 (1,9)*
TNF- α	-	1	-	-2,9 (1,0)*

G1: Grupo 1; G2: Grupo 2; G3: Grupo 3. G1 calibrador - G2/G1: número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso no G2 em relação ao G1; G3/G1: número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso no G3 em relação ao G1; G2 calibrador - G3/G2: número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso no G3 em relação ao G2. α -SMA: *smooth muscle alpha-actin*; Col1a1: colágeno; COX-2: ciclooxigenase 2; IL: interleucinas 1, 4, 6, 8 e 10; MCP-1: quimioatração de células mononucleares; Mif: fator de inibição da migração de macrófagos; MIP-3 α : quimioatração de células mononucleares; MMP: metaloproteinases 2 e 9; Pap: *pancreatitis-associated protein*; TNF- α : fator de necrose tumoral α ; 18S: RNA 18S ribossomal. Os valores estão representados como média (erro padrão da média). N amostral: G₁: 6 animais; G₂: 8 animais; G₃: 9 animais. Para admitir diferenças estatisticamente significativas foi considerado $p < 0,05$. * $p < 0,01$ (ANOVA).

Conforme mostra a Figura 13, α -SMA e MIP-3 α (Figura 13A e 13J) são aproximadamente 2,2 vezes menos expressos no Grupo 3 (PAC + vitamina E) em relação ao Grupo 2 (PAC); COX-2 (Figura 13C), 3,5 vezes menos expresso; IL-6 (Figura 13E), 2,5 vezes menos expresso; Pap (Figura 13L), 4,5 vezes mais expresso; e TNF- α (Figura 13M) 2,9 vezes menos expresso ($p < 0,01$).

A **B**

C **D** **E**

F **G** **H**

I

J

K

L

M

Figura 13. Quantidade relativa de (A): α -SMA; (B): Col1a1; (C): COX-2; (D): IL-4; (E): IL-6; (F): IL-8; (G): IL-10; (H): MCP-1; (I): Mif; (J): MIP-3 α ; (K): MMP-2; (L): Pap; (M): TNF- α nos grupos (G1: Controle sem tratamento, G2: Pancreatite alcoólica crônica, G3: Pancreatite alcoólica crônica + Vitamina E) após 6 semanas de tratamento. G1 calibrador - G2/G1: número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso no Grupo 2 em relação ao Grupo 1; G3/G1: número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso no Grupo 3 em relação ao Grupo 1; G2 calibrador - G3/G2: número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (-) expresso no Grupo 3 em relação ao Grupo 2. Os valores estão representados como média (erro padrão da média). N amostral: G1: 6 animais; G2: 8 animais; G3: 9 animais. Para admitir diferenças estatisticamente significativas foi considerado $p < 0,05$. * $p < 0,01$ (ANOVA).

Discussão

5. DISCUSSÃO

O modelo experimental de alcoolismo crônico proposto por Lieber e DeCarli (1989), desenvolvido neste estudo com alterações nas quantidades de α -tocoferol, representa um modelo clássico descrito na literatura. Está bem estabelecido que a ingestão de etanol na quantidade de 35,5% do valor calórico total (VCT) da dieta líquida é suficiente para resultar em considerável nível sanguíneo de etanol, o qual então é metabolizado preferencialmente pela via oxidativa em diferentes tecidos, incluindo o pâncreas, alterando o estado de repouso do tecido por meio da indução do estresse oxidativo e da resposta inflamatória. O consumo da dieta líquida fornece todos os nutrientes necessários para assegurar o crescimento e desenvolvimento normais dos animais no Grupo Controle, enquanto os ratos que recebem etanol desenvolvem esteatose hepática, a qual é evidente morfológica e bioquimicamente (LIEBER, 1994). Dessa forma, o modelo de Lieber e DeCarli é considerado, portanto, de conhecida relevância clínica (LIEBER & DECARLI, 1989).

Na dieta líquida (LIEBER & DECARLI, 1989), as duas únicas diferenças na composição, entre a dieta controle e a que contém etanol, estão nas quantidades de sacarose e de etanol, para que se mantenha a mesma densidade calórica. A dieta controle é normoglicídica, com 47,0% do VCT de carboidrato. A dieta na qual é acrescido etanol, as calorias de carboidrato são substituídas pelas de etanol, resultando em 35,5% do VCT de etanol e 11,5% do VCT de carboidrato, tornando-a hipoglicídica. As fontes de carboidrato da dieta são amido e sacarose, e apenas a quantidade de sacarose é diminuída para que se obedeça ao VCT de 11,5%. Lieber e cols. (1965), por meio de estudos modificando a composição para hipolipídica e normoglicídica na dieta que contém etanol (as calorias de lipídeo foram substituídas pelas do etanol), e hipoglicídica na dieta controle isenta de etanol, comprovaram que

as alterações relacionadas à ingestão da dieta líquida, proposta originalmente em 1963 (LIEBER et al., 1963), são devidas exclusivamente ao efeito do álcool, e não às alterações nas quantidades de carboidrato.

A sacarose é capaz de modular a expressão gênica, porém, até o presente estudo, nenhum trabalho mostrou influência da deficiência ou de quantidades normais de ingestão de sacarose na expressão gênica especificamente dos marcadores inflamatórios avaliados neste trabalho. Entre os genes que podem ser geneticamente regulados pela sacarose, estão as proteínas que auxiliam no enovelamento de outras proteínas (hsp70 – *heat shock protein*) e que atuam na degradação de catecolaminas (COMT - *Catechol-O-methyl transferase*) no tecido coronariano, as quais estão envolvidas com a patogênese da hipertensão; proteínas envolvidas no transporte de elétrons na mitocôndria das células do tecido adiposo e fígado (NDUFB6 - *NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 β subcomplex 6*), cuja disfunção possui relação com a obesidade; e enzimas do metabolismo de carboidratos (glicose-6-fosfato desidrogenase e hexoquinase) no fígado, cujas alterações participam dos mecanismos de resistência à insulina e de estresse oxidativo nas infecções (LOMBA et al., 2010; LOMBA et al., 2009; MAIZTEGUI et al., 2006; BUSSEROLLES et al., 2002; BIZEAU et al., 2001; SPOLARICS, 1999). Li e cols. (2005b) mostraram que, na doença hepática gordurosa não-alcoólica, uma dieta rica em sacarose pode diminuir as células natural killers (NKT) do sistema imune inato no fígado e aumentar sua apoptose, contudo análises de expressão gênica não foram realizadas. Portanto, a deficiência de sacarose nos Grupos 2 e 3 e a dieta normoglicídica do Grupo 1, considerando-se as dietas possuírem a mesma densidade energética de 1 kcal/mL e a ingestão ter sido controlada por *pair-fed*, não

interferiram com os resultados de histopatologia e de expressão gênica apresentados por este trabalho.

Neste trabalho, a dieta de Lieber e DeCarli (1989) foi administrada por 6 semanas, além de 1 semana de adaptação ao etanol. Apesar de outros estudos descreverem um período experimental igual ou superior a 8 semanas (GUKOVSKY et al., 2008; LI et al., 2008; KUBISCH et al., 2006), foram utilizados 6 semanas a partir de resultados de experimentos previamente realizados neste laboratório, no qual com 6 semanas já se observaram as alterações clínicas descritas por Lieber (2005), típicas deste modelo experimental de alcoolismo crônico (SIQUEIRA-SILVA, 2010; ZANUTO, 2005). Além disso, ratos machos da linhagem Wistar, segundo observado em todos os experimentos deste laboratório, possuíram diminuição da expectativa de sobrevivência a partir da 7ª semana de tratamento com etanol a 35,5% do VCT, se incluída a semana de adaptação. O consumo crônico de etanol, associado à ocorrência de pancreatite, agrava ainda mais a sobrevivência dos animais.

Ratos do gênero masculino foram os utilizados neste trabalho, uma vez que, na literatura, a maior parte dos estudos que reproduzem o modelo experimental de alcoolismo crônico em ratos também utilizaram os machos (DAS et al., 2009; GUKOVSKY et al., 2008; LI et al., 2008; DAS et al., 2006; KUBISCH et al., 2006; ANDICAN et al., 2005; JORDÃO JR. et al., 2004; KANBAGLI et al., 2002; ALENYIK et al., 1999). A linhagem Wistar foi a escolhida pois, como este trabalho visava reproduzir o primeiro modelo experimental de pancreatite alcoólica crônica descrito por Gukovsky e cols. (2008), foi escolhida a mesma linhagem e gênero que estes utilizaram.

Trabalhos que avaliam expressão gênica não necessitam de um n amostral superior a 10 quando se utiliza o rato como organismo em estudo, uma vez que a variabilidade interindividual entre ratos Wistar é pequena. Outros estudos, cuja metodologia também foi o RT-PCR quantitativo, utilizaram 2 e 5 ratos (GUKOVSKY et al., 2008; LI et al., 2001), e os que utilizaram *microarrays*, 4 ratos (SIQUEIRA-SILVA, 2010; KUBISCH et al., 2006). Neste trabalho, o Grupo Controle iniciou e completou o experimento com 6 animais, e os dois Grupos em que houve a indução da pancreatite alcoólica crônica iniciaram com 10, porém houve perdas de 2 e 1 animais respectivamente nos grupos com quantidades normal (Grupo 2) e suplementada com vitamina E (Grupo 3). Dessa forma, o n foi suficiente para a análise de expressão gênica proposta pelo estudo.

Vários ensaios clínicos têm descrito uma estrita relação entre alcoolismo e pancreatite, entretanto, encontra-se na literatura que apenas o consumo crônico isolado de etanol não é suficiente para causar pancreatite (GUKOVSKY et al., 2008; LI et al., 2008; LERCH et al., 2003; PANDOL et al., 1999; DURBEC & SARLES, 1978). Certamente, o uso de etanol a longo prazo aumenta a predisposição do pâncreas a outros agentes ou eventos celulares nocivos, devido à alteração do estado basal, sensibilização das células acinares e redução dos mecanismos de defesa antioxidante deste tecido (GUKOVSKY et al., 2008; LI et al., 2008).

Estabelece-se o quadro de pancreatite alcoólica por meio do consumo crônico de etanol e da concomitante hiperestimulação da secreção da colecistoquinina (CCK). Este hormônio, produzido no intestino, em concentrações fisiológicas estimula a secreção pancreática de enzimas no trato digestivo, entretanto, em altas doses, contribui para a ativação precoce das enzimas proteolíticas no próprio tecido pancreático, iniciando a autodigestão do tecido (GUKOVSKY et al., 2008; DENG et

al., 2005; LERCH et al., 2003; PANDOL et al., 1999; LERCH & ADLER, 1994). Ainda, a administração de ciclosporina A (CsA), um imunossupressor, em combinação com episódios repetidos de pancreatite aguda induzida por ceruleína (Cer), um análogo da CCK, resultou em pancreatite crônica cerca de 1 a 2 semanas após a indução aguda, comprovada por análise histopatológica e morfológica, segundo Gukovsky e cols. (2008), os quais foram o primeiro grupo a publicar um modelo experimental crônico da pancreatite alcoólica. A CsA possui relação com o processo de fibrogênese no pâncreas, dificultando o processo de reparo no tecido sensibilizado pelo etanol, estabelecendo-se, assim, o quadro crônico da patologia (GUKOVSKY et al., 2008).

A CsA atua especificamente e de maneira reversível nos linfócitos, bloqueando-os na fase G_0 ou G_1 do ciclo celular e inibindo a liberação de linfocinas pelas células T ativadas, desencadeada por antígenos. A CsA não deprime a hematopoiese e não tem efeito sobre a função das células fagocitárias (Sandimmun® – Novartis). Uma vez que a pancreatite alcoólica crônica se caracteriza por infiltrado inflamatório de células mononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos), neste estudo apenas foi avaliada a expressão de genes biomarcadores do processo inflamatório relacionados à ação de monócitos e de macrófagos, além de outras quimiocinas, citocinas, e proteínas do processo de reparo e de fibrogênese, pois estes não se alteram com a terapia imunossupressora com CsA, conferindo maior confiabilidade aos resultados, ao contrário dos linfócitos.

O ganho de peso e a ingestão da dieta não apresentaram diferenças entre os três grupos experimentais, garantindo iguais condições de crescimento e de desenvolvimento aos animais. A ingestão de etanol foi igual entre os Grupos 2 e 3, e como as doses de CsA e de Cer administradas foram calculadas com base no peso

corporal (20 mg/kg e 20 µg/kg respectivamente), todos os animais foram submetidos às mesmas condições para o desenvolvimento da pancreatite alcoólica crônica. Assim, a análise dos dados referentes à ingestão mostrou que os grupos ingeriram quantidades semelhantes de dieta, o que mostra que o pareamento realizado (*pair-fed*) foi efetivo.

A dieta líquida de Lieber e Decarli (1989) foi preparada com alterações nas quantidades de vitamina E. O etanol é hidrossolúvel e prontamente absorvido pelo trato gastrointestinal, no estômago e intestino delgado. Em indivíduos saudáveis e não-alcoólatras, a absorção pela parede do estômago pode chegar a 39% durante a primeira hora pós-prandial, aumentando-se para 73% conforme ocorre o esvaziamento gástrico de alimentos (LIEBER, 2005; CORTOT et al., 1986). A vitamina E é lipossolúvel e necessita de condições semelhantes às gorduras, como a presença de bile para formação de micelas e absorção pelo intestino delgado. A vitamina solubilizada nas micelas é transportada pela membrana da borda em escova dos enterócitos por difusão passiva, os ésteres de tocoferol são hidrolisados no intestino delgado, e alcançam o fígado nos quilomícrons remanescentes. Nutrientes que aumentam a biodisponibilidade da vitamina E são os lipídeos, presentes na quantidade de 35,0% do VCT da dieta de Lieber e DeCarli (DE BORTOLI & COZZOLINO, 2009; KAYDEN & TRABER, 1993; LIEBER & DECARLI, 1989). Dessa forma, a presença de etanol concomitante a doses suplementares de vitamina E na dieta não interferiu com a biodisponibilidade e absorção de cada componente pelo organismo do animal, pois ocorreram por mecanismos diferentes.

A suplementação com vitamina E foi administrada na dose de 20x a AIN-93 (NAP, 1995), uma vez que estudo anterior realizado neste laboratório mostrou ocorrer alterações no perfil global de expressão gênica relacionados a essa

quantidade de tocoferol, em modelo de alcoolismo crônico (SIQUEIRA-SILVA, 2010). A suplementação de vinte vezes representa uma dose farmacológica, cujo efeito do α -tocoferol é então potencializado.

A ingestão de vitamina E não apresentou diferença estatística entre os Grupos 1 e 2, e foi significativamente maior para os animais do Grupo 3, o qual também apresentou maiores níveis de α -tocoferol no plasma e no fígado, comprovando a eficiente suplementação deste grupo. Os níveis hepáticos de α -tocoferol no Grupo 3 também foram maiores quando os dados foram normalizados por miligrama de lipídeos totais hepáticos, uma vez que a vitamina E necessita de lipoproteínas para armazenagem no fígado. Neste trabalho, mesmo com a ingestão de doses suplementares no Grupo 3, as concentrações plasmáticas de vitamina E aumentaram apenas em quantidades de duas a quatro vezes superiores em relação ao grupo com ingestão normal da vitamina (3,1x em relação ao Grupo 1 e 2,0x em relação ao Grupo 2). Essa faixa de aumento vai ao encontro do que é descrito na literatura, uma vez que tais quantidades de elevação no plasma já são suficientes para aumentarem a distribuição de α -tocoferol para os tecidos (KAYDEN & TRABER, 1993; DIMITROV et al., 1991; FARRELL & BIERI, 1975).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos 1 e 2 quanto aos níveis de α -tocoferol no plasma e fígado, mostrando que o consumo de álcool e a indução de pancreatite não influenciaram no estoque e/ou utilização dessa vitamina, quando ingerida em quantidades normais.

Jordão Jr. e cols. (2004) também não encontraram alterações nos níveis plasmáticos e hepáticos de vitamina E mediante administração de etanol e de quantidade normal recomendada de vitamina E para ratos (JORDÃO JR. et al., 2004). Outros estudos observaram redução significativa da vitamina E tanto

plasmática quanto hepática no alcoolismo em animais, devido provavelmente à utilização da vitamina no processo de detoxificação e recuperação após o consumo de etanol (JORDÃO JR. et al., 2002; TYÖPPÖNEN & LINDROS, 1986). Há os que mostram redução apenas na vitamina E hepática, não alterando seus níveis plasmáticos em relação ao Grupo Controle (KANBAGLI et al., 2002; SADRZADEH et al., 1994; BJONERBOE et al., 1990), e redução na vitamina E hepática, com aumento na plasmática, o que poderia estar relacionado à hiperlipemia (KAWASE et al., 1989). A variação encontrada nos dados da literatura do efeito do consumo alcoólico crônico sobre os níveis de alfa-tocoferol hepático e plasmático de ratos parece depender, pelo menos em parte, da dose administrada de vitamina E, e da dose e período de exposição ao etanol.

Neste trabalho, a dose normal correspondente à AIN-93 de vitamina E associada ao tratamento crônico por 6 semanas com álcool a 35,5% do VCT não alteraram os níveis plasmáticos e hepáticos de vitamina E no Grupo 2. É possível que, nessa situação de consumo crônico de etanol, o estoque de α -tocoferol ainda não tenha sido utilizado pelo fígado, uma vez que a resposta inflamatória induzida pelo álcool ainda encontrava-se em estágios iniciais no pâncreas. Também poderia estar relacionado ao fato de que o organismo teve tempo suficiente para reposição dos estoques, pela diminuição da excreção da vitamina ingerida. Ou ainda, que grande parte do radical α -tocoferoxil formado já tenha sido regenerado a α -tocoferol por meio da ação de diferentes agentes, como ácido ascórbico, o qual foi ingerido nas quantidades normais recomendadas pelos animais, glutathione e ácido úrico (KAYDEN & TRABER, 1993; KAGAN et al., 1992; BISBY & PARKER, 1991; NIKI, 1991; PACKER et al., 1979). O Grupo 3, por apresentar os maiores resultados de vitamina E plasmática e hepática, além da maior ingestão, ratifica a hipótese de que

as alterações na expressão gênica sejam decorrentes da suplementação com vitamina E, a qual foi a única característica diferencial deste grupo.

Não foi possível dosar a quantidade de vitamina E no pâncreas pois, por ser um tecido difuso e escasso, foi totalmente utilizado para a extração de RNA e análise histopatológica. O fígado é o local principal de estoque de vitamina E, tendo sido o utilizado neste trabalho para avaliação dos estoques e comprovação da suplementação. Uma menor proporção da vitamina E é estocada em tecidos extra-hepáticos, particularmente nos locais em que a produção de radicais livres é maior, como nas membranas mitocondriais e no retículo endoplasmático do coração e dos pulmões (DE BORTOLI & COZZOLINO, 2009). Portanto, a dosagem de α -tocoferol no pâncreas não seria relevante, uma vez que este não configura tecido estoque de vitamina lipossolúvel, tal qual o fígado.

A avaliação dos níveis hepáticos de lipídeos totais, neste estudo, revelou uma maior quantidade no Grupo 3, e não houve diferença estatística quando comparados Grupos 1 com 2. A maior quantidade de lipídeos hepáticos no Grupo 3 foi provavelmente relacionado ao maior estoque de α -tocoferol, cuja suplementação seria a única característica diferencial deste grupo, e não estaria relacionado ao consumo de etanol, uma vez que o Grupo 2, o qual também recebeu etanol, não apresentou maiores quantidades significativas de lipídeos totais. A vitamina E, por ser lipossolúvel, necessita de lipoproteínas para o estoque hepático, contudo o local e os mecanismos de estoque no fígado ainda não foram completamente esclarecidos. Questiona-se quanto ao local, se nas células de Ito (ou células estreladas), as quais armazenam vitamina A na forma de ésteres de retinol, se no hepatócito, o qual seria pouco provável, pois caracterizaria uma degeneração (PAULA et al., 2006; COTRAN et al., 2000). O conhecimento dos mecanismos de

estoque hepático de vitamina E poderiam contribuir para elucidar se há relação direta com os lipídeos totais hepáticos no alcoolismo.

Kanbagli e cols. (2002) encontraram aumento no nível de lipídeos totais no fígado de ratos que receberam tratamento crônico de etanol. Neste trabalho, o contrário foi observado pela análise do Grupo 2, o qual não apresentou diferença estatística com o Grupo Controle. Porém, o presente trabalho teve como diferenciais a ocorrência de pancreatite associada ao consumo crônico de etanol, e a suplementação com uma vitamina lipossolúvel.

A análise histopatológica do tecido pancreático mostrou focos de destruição da arquitetura das células acinares, infiltrado inflamatório composto por células mononucleares (tendo sido possível diferenciar alguns linfócitos e plasmócitos) e proliferação de tecido conjuntivo de sustentação, como mecanismo inicial de reparo. Tais achados configuram como típicas alterações de pancreatite alcoólica crônica, porém ainda em estágio bastante inicial. A coloração HE (hematoxilina e eosina) não permite diferenciar o processo de fibrose, para isso seria necessário outro tipo de coloração ou ensaio imunohistoquímico. Porém, os achados foram suficientes para confirmarem o início da pancreatite alcoólica do tipo crônica. O desenvolvimento da pancreatite mostrou-se qualitativamente semelhante nos Grupos 2 e 3, independente da suplementação com vitamina E.

No trabalho de Gukovsky e cols. (2008), a indução da pancreatite alcoólica crônica, também por meio das mesmas doses de CsA e de Cer, e mesma dieta proposta por Lieber e Decarli (1989), porém com duas semanas a mais de ingestão de etanol (total de 8 semanas), resultou em achado histopatológico mais típico e avançado. O tecido pancreático apresentou grande perda de células acinares, restando cerca de 13% do tecido original, extenso infiltrado inflamatório

mononuclear, composto por macrófagos e linfócitos, presença de fibroblastos e de fibrilas de colágeno e fibrose (GUKOVSKY et al., 2008).

É provável que o tempo de tratamento tenha interferido com o tipo de resposta do tecido pancreático, pois neste trabalho os ratos passaram por 6 semanas de tratamento com etanol, duas a menos em relação ao trabalho de Gukovsky e cols. (2008). Dessa forma, o etanol poderia potencializar a pancreatite nos animais, de forma que, se fossem acrescentadas mais duas semanas de ingestão da dieta líquida antes de iniciado o período em que houve a injeção de CsA e de Cer, possivelmente se observariam achados típicos de pancreatite alcoólica crônica em estágio mais avançado.

Já está bem estabelecido na literatura, e por meio de experimentos anteriores realizados neste laboratório, que o consumo crônico de etanol induz a esteatose hepática em ratos (SIQUEIRA-SILVA, 2010; ZANUTO, 2005; LIEBER & DECARLI, 1989). Uma vez que o fígado é um dos órgãos mais acometidos pelo modelo animal de alcoolismo crônico proposto por Lieber e DeCarli (1989) (LIEBER, 2005; LIEBER, 2004; LIEBER, 1994), as análises hepáticas de histopatologia e de lipídeos totais foram propostas neste estudo como ferramentas adicionais e secundárias para confirmação da reprodução do modelo experimental de Lieber, e para avaliação da resposta a partir de uma nova situação, a concomitante indução de pancreatite crônica.

No presente trabalho, o fígado do Grupo 1 (Controle) apresentou histologia normal, enquanto os animais que receberam etanol (Grupos 2 e 3) desenvolveram esteatose em grau moderado, entretanto com alta variabilidade entre os diferentes animais, de 30 a 60%. A esteatose não configurou um quadro típico de resposta dos animais deste estudo conforme o descrito em trabalhos anteriores que utilizaram o

modelo de Lieber e DeCarli (1989), em que a esteatose se desenvolve com valor mínimo de 60%, ou seja, grave (SIQUEIRA-SILVA, 2010; LIEBER, 2005; ZANUTO, 2005). Conforme estudos já realizados neste laboratório, foi mostrado que a suplementação com vitamina E 20x não preveniu a esteatose hepática em animais cronicamente tratados com álcool (SIQUEIRA-SILVA, 2010). Ambos os Grupos 2 e 3 apresentarem esteatose em grau bastante variável e semelhante, contudo a determinação de lipídeos totais hepáticos mostrou aumento apenas no Grupo 3, fato já discutido, provável à suplementação com vitamina E, e não ao consumo de etanol. A análise do peso total do fígado foi maior no Grupo 1, entretanto, quando normalizado por 100 gramas de peso corporal, com a finalidade de minimizar o possível efeito do peso corporal final de cada animal, não houve diferença entre os três grupos.

Apesar de o fígado ser um dos órgãos mais acometidos pelo consumo alcoólico crônico, o menor grau de esteatose hepática observado neste trabalho ocorreu possivelmente devido à ativação da resposta inflamatória no tecido pancreático.

A oxidação do etanol pela álcool desidrogenase, bem como a conversão do acetaldeído a acetato, geram uma proporção elevada de NADH/NAD⁺ no citosol do hepatócito, o que provoca mudanças no estado de óxido-redução e desencadeia inúmeras alterações em certas vias metabólicas, resultando na incapacidade de sintetizar lipoproteínas necessárias para o transporte de triacilgliceróis para os tecidos extra-hepáticos. Tal fato, associado à elevada síntese de triacilgliceróis no alcoolismo, favorece a esteatose hepática no alcoolismo crônico (LIEBER, 2004).

Existem trabalhos clínicos descrevendo baixos índices de coexistência de pancreatite alcoólica crônica e injúria hepática (HASTIER et al., 1999; MONTES,

1995; DEL OLMO MARTÍNEZ et al., 1992; ICHIHARA et al., 1992; ANGELINI et al., 1985; STROLE JR. & VICKERY JR., 1975; WORK GROUP III, 1975). Por este trabalho, uma vez estabelecidas as primeiras alterações decorrentes da pancreatite, há a possibilidade de o pâncreas ter sido o local de atração preferencial dos metabólitos oxidativos do etanol, ao invés do fígado, uma vez que os leucócitos presentes na região de inflamação liberam uma substância denominada mieloperoxidase, a qual aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no pâncreas, formando um ciclo vicioso (OLSZEWER, 2009). Além disso, ROS, por sua vez, estimulam a ativação de NF- κ B e o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias no local em que são produzidos (PUROHIT et al., 2003). Portanto, o aumento do estresse oxidativo na vigência de resposta inflamatória crônica ativada no tecido pancreático possivelmente amenizaram a injúria no fígado em decorrência do metabolismo do etanol, como o acúmulo de lipídeos no interior dos hepatócitos.

É conhecido que a alteração do estado basal de um órgão específico seja consequência da expressão gênica. Trabalhos anteriores com ratos mostraram que o consumo alcoólico crônico, a presença de pancreatite alcoólica e a suplementação com vitamina E são eventos que podem alterar de forma independente a expressão gênica, por diferentes mecanismos (GUKOVSKY et al., 2008; ZINGG, 2007b; KUBISCH et al., 2006; AZZI et al., 2004). Apesar de a análise histopatológica da pancreatite alcoólica crônica nos Grupos 2 e 3 ter mostrado alterações típicas ainda em estágios iniciais, as alterações de expressão gênica encontraram-se bem estabelecidas, uma vez que modificações de ordem genética ocorrem antes que as de nível bioquímico, fisiológico e morfológico.

A atividade antioxidante da vitamina E já está bem documentada, desde 1931. A partir de 1967, suas atividades biológicas não antioxidantes começaram a ser descobertas, e somente em 2003 descobriu-se sua participação na modulação da expressão gênica e da transdução de sinal (ZINGG et al., 2007a). Segundo revisão publicada por Brigelius-Flohé (2009), entre as vias mais importantes moduladas pela vitamina E estão aquelas relacionados com a resposta inflamatória, sendo que os tocoferóis possuem propriedades anti-inflamatórias (VASU et al., 2007; HAN et al., 2006; LIN et al., 2002). A ingestão de vitamina E acima da recomendação, por alimentos ou suplementos, pode regular o sistema imune e as interações das células inflamatórias com tecidos-alvo, por meio de vários mecanismos, como a redução da liberação de citocinas, inibição da agregação plaquetária pela inibição da COX-2, alteração na proliferação das células do músculo liso, controle do tônus vascular, e redução da interação do endotélio vascular com células inflamatórias e do sistema imune (OZER et al., 1995; STEINER, 1991).

Em revisões publicadas por Zingg (2007b) e Azzi e cols. (2004), o α -tocoferol é capaz de alterar a expressão gênica por meio da modulação de enzimas específicas envolvidas com a transdução de sinal: a proteína C quinase, proteína B quinase, proteína tirosina-quinase, lipoxigenases, ciclooxigenase-2, fosfolipase A2, fosfatase protéica 2A, tirosina-fosfato, diacilglicerol quinase, e o fosfatidilinositol-3-quinase. Entre os vários genes que podem ser regulados pela vitamina E, estão os envolvidos com a formação/degradação da matriz extracelular, como o colágeno e a metaloproteinase, e os envolvidos com a resposta inflamatória, como interleucinas e fatores inflamatórios (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2009; AZZI et al., 2004).

Em experimento anterior realizado neste laboratório, foram encontradas maiores evidências de possível ação anti-inflamatória protetora do α -tocoferol em

modelo de alcoolismo crônico (SIQUEIRA-SILVA, 2010). Em ratos que receberam a dieta de Lieber e DeCarli (1989) por seis semanas, houve presença de infiltrado inflamatório no fígado apenas do grupo que não recebeu a suplementação 20x de vitamina E, segundo análise por histopatologia, sendo que no grupo que recebeu etanol com a suplementação de 20x, não houve o infiltrado inflamatório. Os dados de expressão gênica global, por meio da técnica de *microarray*, corroboraram a provável função protetora da vitamina E indicada pelos achados histopatológicos, resultando em um perfil de expressão diferencial de 120 genes no grupo que recebeu o etanol concomitante à suplementação 20x de α -tocoferol.

A resposta inflamatória e o estresse oxidativo são eventos que ocorrem de forma sinérgica na ocorrência da pancreatite alcoólica crônica, e resultam em um equilíbrio dinâmico do organismo. O acetaldeído, produzido pela oxidação do etanol, dentre os vários efeitos tóxicos que apresenta, é capaz de formar aduto com o pró-peptídeo carboxi-terminal do pró-colágeno, ativando a síntese de colágeno. Os adutos acetaldeído-proteína também podem atuar como antígenos, e ativar a resposta imune. Os produtos da peroxidação lipídica, a produção de TGF- α (fator de transformação do crescimento - alfa) e a hiperlactacidemia induzida pelo etanol também estimulam a síntese de colágeno, podendo contribuir para o desenvolvimento de fibrose (LIEBER, 2004). Além disso, na região onde há resposta inflamatória, os leucócitos, quando ativados, estimulam a produção de ROS por meio da liberação de uma substância, a mieloperoxidase (OLSZEWER, 2009). A maior concentração de ROS configura um importante meio de proteção orgânica contra o desenvolvimento de infecções oportunistas, uma vez que ROS atuam como bactericidas. Macrófagos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos são os principais fagócitos estimuladores da liberação de ROS, além de fibroblastos, linfócitos B e

células endoteliais também liberarem radical superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (PAGLIUSO et al., 2006).

Portanto, é possível que a suplementação com α -tocoferol, na presença de pancreatite alcoólica crônica em ratos, possa contribuir para a diminuição da gravidade da patologia por meio de dois mecanismos, a diminuição da resposta inflamatória – pela modulação da expressão gênica e da transdução de sinal de enzimas específicas, e a diminuição do estresse oxidativo – pela ação antioxidante direta.

Este trabalho teve como objetivo, por meio da análise da expressão gênica em ratos, encontrar maiores evidências que pudessem auxiliar na descoberta dos mecanismos envolvidos com a pancreatite alcoólica crônica, a partir da modulação de marcadores inflamatórios pela suplementação com vitamina E. De todos os 15 genes inicialmente propostos neste trabalho, apenas 2 não apresentaram amplificação no tecido pancreático em nenhum dos três grupos de estudo, que foram a interleucina 1 e a metaloproteinase 9, conforme avaliado em gel do produto purificado de PCR qualitativo. Isto pode estar relacionado à ausência de expressão desses transcritos no tecido pancreático desses animais, ou a defeitos no desenho ou fabricação dos respectivos oligonucleotídeos iniciadores específicos. Portanto, eles foram excluídos das análises, totalizando 13 genes em estudo. O TNF- α não apresentou amplificação no Grupo 1 (Controle), somente nos Grupos 2 e 3, portanto, para este gene, apenas o Grupo 2 foi utilizado como grupo calibrador.

A expressão diferencial no tecido pancreático de todos os genes biomarcadores inflamatórios avaliados, nos Grupos 2 e 3 em relação ao Grupo 1, mostrou indícios de que neste momento houve um quadro genético estabelecido de pancreatite alcoólica crônica, ainda que em estágio inicial pela histopatologia,

independente da suplementação com vitamina E. Dos 13 genes estudados, 6 apresentaram diferença de expressão associados à suplementação com α -tocoferol, ou seja, no Grupo 3 em relação ao Grupo 2, mostrando ter ocorrido um estímulo modulatório da vitamina na injúria pancreática.

Em relação ao Grupo 1 (Controle), todos os genes, com exceção do TNF- α , apresentaram aumento de expressão na presença de pancreatite alcoólica crônica, tanto no Grupo 2 quanto no Grupo 3, independente da suplementação com vitamina E. TNF- α não obteve amplificação no Grupo 1, portanto este tipo de análise não foi possível. Isso sugere que o modelo experimental para indução de pancreatite alcoólica crônica foi efetivo, levando à alterações nos números de transcritos de genes relacionados às atividades pró e anti-inflamatórias.

Em trabalho de Gukovsky e cols. (2008), também houve aumento, na presença de pancreatite alcoólica crônica, no nível de transcritos para TNF- α , IL-6, IL-10, MCP-1, MIF, MIP-3 α , colágeno (Col1a1) e MMP-2. Grady e cols. (1997) verificaram, por *Northern Blot*, que diferentes quimiocinas, como o MCP-1, têm sua expressão induzida nas células acinares do pâncreas imediatamente após a estimulação aguda por Cer, ou seja, em estágios iniciais da pancreatite aguda. Pelo presente estudo, semelhantes resultados foram observados. Em trabalho de Li e cols. (2008), o tratamento crônico com etanol, porém sem a ocorrência de pancreatite, não modificou as quantidades de α -SMA, COX-2 e colágeno no pâncreas, quando analisados por *Western Blot*, mas análises de expressão gênica não foram realizadas. Segundo Das e cols. (2009), o consumo alcoólico crônico, também com ausência de pancreatite, ocasionou o aumento dos níveis séricos de IL-10 e TNF- α , e diminuição da IL-4, contudo análises de expressão gênica também não foram realizadas.

Neste trabalho, os fatores pró-inflamatórios cujo número de transcritos aumentou na presença de pancreatite alcoólica crônica, independente da vitamina E, foram as quimiocinas MCP-1 e IL-8, a citocina Mif, colágeno e MMP-2. MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein*) é responsável pela quimioatração mista de leucócitos, especialmente monócitos, macrófagos e linfócitos (CHARO & RANSOHOFF, 2006; ABBAS, 2003; DALY & ROLLINS, 2003). Macrófagos são células fagocíticas encontradas nos tecidos, se originam de monócitos presentes na circulação sangüínea, e desempenham funções importantes nas respostas imunes inatas e adquiridas. Quando ativados por produtos microbianos e por citocinas das células T, provocam a fagocitose de partículas estranhas, produzem citocinas inflamatórias e apresentam antígenos às células T auxiliares (CHARO & RANSOHOFF, 2006; ABBAS, 2003).

A IL-8 (interleucina 8) auxilia no recrutamento de fagócitos, especialmente neutrófilos (ABBAS, 2003). Ambas as quimiocinas MCP-1 e IL-8 medeiam e regulam a imunidade inata, sendo, portanto, produzidas principalmente por fagócitos mononucleares, tais como macrófagos ativados e células T. Fagócitos mononucleares são os tipos celulares encontrados na resposta inflamatória crônica, tal qual a proposta deste trabalho, pancreatite alcoólica crônica (ABBAS, 2003).

O Mif (*macrophage migration inhibitory factor*) atua na imobilização de fagócitos mononucleares, um efeito que mantém as células retidas no local da inflamação (GUKOVSKY et al., 2008; ABBAS, 2003). Colágeno e MMP-2 (*matrix metalloproteinase 2*) são mediadores do processo de reparo do tecido pancreático, sendo estimulados na ocorrência de injúria, e estão relacionados ao processo de fibrogênese (ABBAS, 2003; APTE & WILSON, 2003; SCHNEIDER et al., 2001; APTE et al., 2000). Normalmente, o aumento da expressão de proteínas do sistema

de reparo é transitório, conforme o processo é finalizado, portanto a manutenção do aumento no nível de transcritos desses genes sugere que a pancreatite alcoólica crônica danificou o processo de reparo, estimulando a injúria pancreática (PARKS et al., 2004).

O fator anti-inflamatório cujo número de transcritos aumentou na presença de pancreatite alcoólica crônica, independente da vitamina E, foi a IL-10. Essa é uma citocina produzida por macrófagos ativados, e sua principal função é inibir os macrófagos ativados, mantendo o controle homeostático das reações imunes inatas e mediadas por células (ABBAS, 2003). A IL-10 também medeia e regula a imunidade inata, sendo produzida principalmente por fagócitos mononucleares, tais como macrófagos ativados e células T, os quais são os tipos celulares encontrados na resposta inflamatória crônica, tal qual a proposta deste trabalho (ABBAS, 2003).

A IL-4 também teve sua expressão gênica aumentada na presença de pancreatite alcoólica crônica, independente da vitamina E. Trata-se de uma citocina com propriedades tanto pró quanto anti-inflamatórias. Produzida principalmente pelo subgrupo Th2 das células T CD4⁺ auxiliares, sua função pró-inflamatória é induzir a diferenciação das células Th2 a partir dos precursores CD4⁺ naive, e estimular a produção de anticorpos da classe IgE pelas células B. Como função anti-inflamatória, atua na supressão das funções dos macrófagos dependentes de interferon- γ (ABBAS, 2003). A IL-4 medeia e regula a imunidade adquirida, sendo, portanto, produzida principalmente por linfócitos T auxiliares, os quais são fagócitos mononucleares, correspondentes ao tipo celular encontrado na resposta inflamatória crônica, tal qual a proposta deste trabalho (ABBAS, 2003).

Em relação ao Grupo 2 (Pancreatite alcoólica crônica), no Grupo 3 (Pancreatite alcoólica crônica + Vitamina E) 5 genes, α -SMA, COX-2, IL-6, MIP-3 α e

TNF- α , apresentaram diminuição de expressão, e 1 gene, Pap, aumento de expressão decorrentes da suplementação com vitamina E, na presença de pancreatite alcoólica crônica.

Até o presente estudo, não há trabalhos na literatura avaliando a expressão gênica de marcadores inflamatórios mediante suplementação com vitamina E, na presença de pancreatite alcoólica crônica. Contudo, já é certo que o α -tocoferol apresenta um efeito direto na diminuição da expressão de genes envolvidos com respostas inflamatórias aguda e crônica, tais como COX-2, colágeno (Col1a1), IL-1, IL-4, e MMP, em patologias como diabetes tipo 2 e hepatite (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2009; ZINGG, 2007b; ZINGG, 2007c; AZZI et al., 2004).

Neste trabalho, a suplementação com vitamina E, na presença de pancreatite alcoólica crônica, diminuiu o número de transcritos apenas de fatores pró-inflamatórios, os quais foram as citocinas TNF- α e IL-6, a quimiocina MIP-3 α , e as proteínas COX-2 e α -SMA, conferindo papel protetor contra a resposta inflamatória exacerbada no pâncreas. O TNF- α (fator de necrose tumoral) é uma das primeiras citocinas a ser produzida e liberada no início da resposta inflamatória. Dentre todas as funções, estão a de estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os sítios de infecção, aumentar a expressão de novas moléculas de adesão nas células endoteliais, induzir macrófagos e células endoteliais a produzirem quimiocinas e promover a apoptose de células-alvo (ABBAS, 2003). A IL-6 (interleucina 6) pode ser produzida por fagócitos mononucleares ativados, e estimula a síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, o crescimento de linfócitos B, a progressão da imunidade inata para adquirida por meio da troca de neutrófilos por macrófagos, e está correlacionada com a gravidade da pancreatite em humanos (JONES, 2005; MAIANSKI et al., 2004; ABBAS, 2003; BHATIA et al., 2000).

O Mip-3 α (*macrophage inflammatory protein*) é derivado de fagócitos mononucleares, e tem como função a quimioatração de leucócitos, especialmente linfócitos T, e de células dendríticas (CHARO & RANSOHOFF, 2006; ABBAS, 2003). As citocinas TNF- α e IL-6, e a quimiocina MIP-3 α medeiam e regulam a imunidade inata, sendo, portanto, produzidas principalmente por fagócitos mononucleares, tais como macrófagos ativados e células T. Fagócitos mononucleares são os tipos celulares encontrados na resposta inflamatória crônica, tal qual a proposta deste trabalho, pancreatite alcoólica crônica (ABBAS, 2003). A vitamina E, portanto, por meio da diminuição do número de transcritos para TNF- α , IL-6 e MIP-3 α , contribuiu como um estímulo anti-inflamatório na pancreatite.

A ciclooxigenase 2 (COX-2) está diretamente relacionada com a gravidade da inflamação no tecido pancreático, e tem como principal função catalisar a conversão dos produtos do ácido araquidônico para prostaglandina (ABBAS, 2003; SCHLOSSER et al., 2002; KOLIOPANOS et al., 2001). Assim como este trabalho em ratos com pancreatite, Schlosser e cols. (2002) também verificaram aumento na expressão de COX-2 em pacientes com pancreatite crônica. A vitamina E é capaz de inibir a atividade catalisadora da COX-2 na síntese de prostaglandinas (E2), reduzindo a agregação plaquetária e o processo inflamatório (ZINGG, 2007a; ZINGG, 2007c). E por este estudo, a vitamina E diminuiu também a expressão gênica da COX-2.

A α -SMA (*α -smooth muscle actin*) é uma proteína presente no citoesqueleto das células pancreáticas estreladas. Na presença de uma inflamação crônica, o aumento da proteína alfa actina do músculo liso inicia a fibrogênese no tecido pancreático, por meio da ativação e proliferação das células pancreáticas estreladas. Dessa forma, a vitamina E diminuiu o estímulo para ativação dessas células

fibrogênicas, por diminuir o número de transcritos para α -SMA, resultado que também foi observado por outros trabalhos com diferentes metodologias (LI et al., 2008; APTE & WILSON, 2003; SCHNEIDER et al., 2001; APTE et al., 2000; HABER et al., 1999).

A suplementação com a vitamina E, na presença de pancreatite alcoólica crônica, aumentou o número de transcritos apenas para a Pap (*pancreatitis-associated protein*), conferindo papel protetor contra os danos no tecido pancreático. A Pap é uma proteína que pode ser utilizada como marcador na vigência de pancreatite, sendo sintetizada pelo pâncreas em uma quantidade cerca de 200 vezes maior na indução de pancreatite aguda experimental (KEIM et al., 1994; KEIM et al., 1991). Pode ser encontrada no pâncreas, suco pancreático ou circulação sangüínea, atingindo-se o pico até 24 horas após injúria pancreática (ZENILMAN et al., 2000). Embora os mecanismos ainda não estejam completamente elucidados, a Pap é um componente importante do mecanismo de defesa contra a injúria pancreática, e possui efeitos protetores contra a pancreatite (ORELLE et al., 1992). Em estudo de Zhang e cols. (2004), a inibição da expressão gênica de Pap exacerbou o dano pancreático avaliado por histologia, e aumentou a expressão das interleucinas 1 e 4 em modelo de pancreatite aguda, piorando a gravidade da inflamação (ZHANG et al., 2004).

Em trabalho de Kubisch e cols. (2006), houve diminuição no nível de transcritos para Pap em ratos que receberam tratamento crônico com etanol, entretanto sem ocorrência de pancreatite. Neste trabalho, a pancreatite alcoólica crônica por si ocasionou o aumento da expressão gênica de Pap, contudo a suplementação com vitamina E foi capaz de estimular significativamente um número

ainda maior de transcritos para Pap na presença de pancreatite, conferindo um estímulo protetor contra a injúria pancreática.

O presente estudo foi capaz de reproduzir o modelo experimental de pancreatite alcoólica crônica, ainda que em estágio inicial. A ferramenta aqui apresentada, que se baseia na análise da expressão gênica, detecta as primeiras alterações que podem ocorrer no organismo, antes que iniciadas as de nível bioquímico, fisiológico e morfológico. Portanto, pode ser aplicada como indicador confiável de avaliação da resposta inflamatória, em conjunto a outras técnicas vigentes, como a análise histopatológica. Outros genes deverão ser analisados mediante estes mesmos tratamentos, objetivando uma melhor visão de possíveis alterações na expressão de genes envolvidos em importantes mecanismos de injúria e de defesa do pâncreas, já que é provável que mudanças na expressão gênica decorrentes da pancreatite reflitam alterações do estado basal do órgão, o que pode explicar sua capacidade em sensibilizar este tecido ao dano.

A avaliação conjunta da expressão gênica com a análise da expressão protéica dos referidos genes, bem como a determinação bioquímica dos níveis teciduais e/ou plasmáticos dos marcadores inflamatórios podem oferecer uma avaliação mais precisa e representativa da real resposta do organismo. Há muitos mecanismos e fatores interferentes envolvidos em toda a via, desde a expressão gênica, transdução de sinal, até a atividade final da proteína. Há a necessidade de estudos que envolvam genômica, para estabelecer quais genes estão presentes no repertório de recursos que o organismo possui; transcriptômica, para determinar a atividade dos mesmos genes em determinado tempo ou local ou condição ambiental; proteômica, para avaliar a estrutura e a função das proteínas resultantes da expressão gênica; e metabolômica, para auxiliar na análise global de todos os

metabólitos celulares (AMARAL et al., 2006). Isso possibilitaria não só a avaliação da resposta inflamatória global na pancreatite alcoólica crônica, mas principalmente uma contribuição para o melhor entendimento a respeito dos mecanismos da resposta biológica à suplementação com vitamina E.

Apesar de a capacidade da vitamina E modular a transdução de sinal e a expressão gênica já ter sido descrita em vários trabalhos, os mecanismos moleculares ainda devem ser elucidados. Vários outros fenômenos correlacionados dificultam a análise precisa dos genes ou eventos que estão sob controle direto do α -tocoferol. Além disso, o presente estudo em ratos ainda não é suficiente para afirmar que as propriedades modulatórias da vitamina E apresentam benefícios na terapêutica da pancreatite alcoólica crônica em humanos. Portanto, estudos que envolvam genômica funcional, transcriptômica, proteômica e metabolômica serão indispensáveis para uma análise completa sobre o papel regulador da vitamina E na pancreatite alcoólica crônica.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

A suplementação com vitamina E apresentou efeitos anti-inflamatórios e benéficos na expressão gênica pancreática de alguns biomarcadores do processo inflamatório em ratos com pancreatite alcoólica crônica.

Na vigência de pancreatite alcoólica crônica, a elevação do número de transcritos para todos os genes biomarcadores da resposta inflamatória na ausência de suplementação com vitamina E, e a correspondente diminuição para alguns genes pró-inflamatórios e aumento para um gene protetor na presença de suplementação com vitamina E comprovaram o benefício do α -tocoferol em doses farmacológicas para ratos. As propriedades modulatórias da vitamina E apresentaram participação em alguns mecanismos envolvidos com a resposta inflamatória da pancreatite alcoólica crônica em animais.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. Cellular and molecular immunology. / Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman; illustrations by David L. Baker, Alexandra Baker – 5th ed., Ed. Saunders, 2003.

ALEYNIK, S. I.; LEO, M. A.; ALEYNIK, M. K.; LIEBRE, C. S. Alcohol-induced pancreatic oxidative stress: protection by phospholipid repletion. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 5-6, p. 609-619, 1999.

AMARAL, A. M. DO.; BAPTISTA, J. C.; WINCK, F. V.; HOMEM, R. A.; MACHADO, M. A. Plataformas tecnológicas no estudo da bactéria causadora do cancro cístico: genômica, transcriptômica e proteômica. **Citrus Research & Technology**, v. 27, n. 2, p. 355-372, 2006.

ANDICAN, G.; GELISGEN, R.; BURCAK, G.; UNAL, E.; TORTUM, O. B.; KARAHASANOGU, T. Oxidative stress and nitric oxide in rats with alcohol-induced acute pancreatitis. **World Journal of Gastroenterology**, v.11, n. 15, p. 2340-2345, 2005.

ANGELINI, G.; MERIGO, F.; DEGANI, G.; CAMPLANI, N.; BOVO, P.; FRATTA PASINI, A.; CAVALLINI, G.; BROCCO, G.; SCURO, L. A. Association of chronic alcoholic liver and pancreatic disease: a prospective study. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 80, n. 12, p. 998-1003, 1985.

APPELROS, S.; THIM, L.; BORGSTORM, A. Activation peptide of carboxypeptidase B in serum and urine in acute pancreatitis. **Gut**, v. 42, n. 1, p. 97–102, 1998.

APTE, M. V. & WILSON, J. S. Alcohol-induced pancreatic injury. **Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology**, v. 17, p. 593-612, 2003.

APTE, M. V.; PHILLIPS, P. A.; FAHMY, R. G.; DARBY, S. J.; RODGERS, S. C.; MCCAUGHAN, G. W.; KORSTEN, M. A.; PIROLA, R. C.; NAIDOO, D.; WILSON, J. S. Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells. **Gastroenterology**, v. 118, n. 4, p. 780–794, 2000.

ARNAUD, J.; FORTIS, I.; BLACHIER, S.; KIA, D.; FAVIER, A. Simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and beta carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 572, n. 1-2, p. 103-116, 1991.

AZZI, A.; GYSIN, R.; KEMPNA, P.; MUNTEANU, A.; NEGIS, Y.; VILLACORTA, L.; VISARIUS, T.; ZINGG, J-M. Vitamin E Mediates Cell Signaling and Regulation of Gene Expression. **The New York Academy of Sciences**, v. 1031, p. 86-95, 2004.

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

BIANCHI, M. L. P. & ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição Campinas**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BISBY, R. H. & PARKER, A. W. Reactions of the α -tocopheroxyl radical in micellar solutions studied by nanosecond laser flash photolysis. **FEBS Letters**, v. 290, p. 205-208, 1991.

BIZEAU, M. E.; THRESHER, J. S.; PAGLIASSOTTI, M. J. A high-sucrose diet increases gluconeogenic capacity in isolated periportal and perivenous rat hepatocytes. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 280, p. E695-E702, 2001.

BJONERBOE, A.; BJONERBOE, G. E.; DREVON, C. A. Absorption, transport and distribution of vitamin E. **Journal of Nutrition**, v. 120, n. 3, p. 233-242, 1990.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Vitamin E: The shrew waiting to be tamed. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, p. 543-554, 2009.

BUEGE, J. A. & AUSI, S. B. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

BUSSEROLLES, J.; ZIMOWSKA, W.; ROCK, E.; RAYSSIGUIER, Y.; MAZUR, A. Rats fed a high diet have altered heart antioxidant enzyme activity and gene expression. **Life Sciences**, v. 71, n. 11, p. 1303-1312, 2002.

CHARO, I. F. & RANSOHOFF, R. M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, p. 610-621, 2006.

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

CHOI, S. W.; STICKEL, F.; BAIK, H. W.; KIM, Y. I.; SEITZ, H. K.; MASON, J. B. Chronic alcohol consumption induces genomic but not p53-specific DNA hypomethylation in rat colon. **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 11, p. 1945-1950, 1999.

CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.

CORTOT, A.; JOBIN, G.; DUCROT, F.; AYMES, C.; GIRAUDEAUX, V.; MODIGLIANI, R. Gastric emptying and gastrointestinal absorption of alcohol ingested with a meal. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 31, p. 343-348, 1986.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins. Patologia Estrutural e Funcional. Trad. 6 ed., Ed. Guanabara Koogan S.A., 2000.

- DALY, C. & ROLLINS, B. J. Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies. **Microcirculation**, v. 10, p. 247-257, 2003.
- DAS, S. K.; VARADHAN, S.; GUPTA, G.; MUKHERJEE, S.; DHANYA, L.; RAO, D. N.; VASUDEVAN, D. M. Time-dependent effects of ethanol on blood oxidative stress parameters and cytokines. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 46, p. 116-121, 2009.
- DAS, D.; MUKHERJEE, S.; DAS, A. S.; MUKHERJEE, M.; MITRA, C. Aqueous extract of black tea (*Camellia sinensis*) prevents ethanol + cholecystokinin-induced pancreatitis in a rat model. **Life Sciences**, v. 78, p. 2194-2203, 2006.
- DE BORTOLI, M. C. & COZZOLINO, S. M. F. Vitamina E (tocoferol). In: COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de nutrientes. 3ª ed. **Barueri: Manole**, 2009.
- DEACIUC, I. V.; ARTEEL, G. E.; PENG, X.; HILL, D. B.; MCCLAIN, C. J. Gene expression in the liver of rats fed alcohol by means of intragastric infusion. **Alcohol**, v. 33, p. 17-30, 2004.
- DEL OLMO MARTÍNEZ, M. L.; MEROÑO GARCÍA, E.; MOREIRA VICENTE, V.; BARBA BERMEJO, M.; CARO-PATÓN GÓMEZ, A. Pancreatic function and morphology in chronic alcoholism with and without cirrhosis. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v. 82, n. 4, p. 225-229, 1992.
- DENG, X.; WANG, L.; ELM, M. S.; GABAZADEH, D.; DIORIO, G. J.; EAGON, P. K.; WHITCOMB, D. C. Chronic alcohol consumption accelerates fibrosis in response to cerulein-induced pancreatitis in rats. **American Journal of Pathology**, v. 166, n. 1, p. 93-106, 2005.
- DIMITROV, M. V.; MEYER, C.; GILLILAND, D.; RUPPENTHAL, M.; CHENOWITH, W.; MALONE, W. Plasma tocopherol concentrations in response to supplemental vitamin E. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 723-729, 1991.
- DURBEC, J. P. & SARLES, H. Multicenter survey of the etiology of pancreatic diseases. Relationship between the relative risk of developing chronic pancreatitis and alcohol, protein and lipid consumption. **Digestion**, v. 18, p. 337-350, 1978.
- ETEMAD, B. & WHITCOMB, D. C. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. **Gastroenterology**, v. 120, p. 682-707, 2001.
- FARRELL, P. & BIERI, J. G. Megavitamin E supplementation in man. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 28, p. 1381-1386, 1975.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

GIROMELLA, M.; IOVANNA, J. L.; SANS, M. Anti-inflammatory effects of pancreatic associated protein in inflammatory bowel disease. **Gut**, p. 1-17, 2005.

GRADY, T.; LIANG, P.; ERNST, S. A.; LOGSDON, C. D. Chemokine gene expression in rat pancreatic acinar cells is an early event associated with acute pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 113, n. 6, p. 1966-1975, 1997.

GREENSBERGER, N. J. & TOSKES, P. P. Acute and chronic pancreatitis. In: Kasper DL ed. **Harrison's Principles of Internal Medicine**. New York: McGraw-Hill, 2005.

GUDGEON, A. M.; HEATH, D. I.; HURLEY, P.; JEHANLI, A.; PATEL, G.; WILSON, C.; SHENKIN, A.; AUSTEN, B. M.; IMRIE, C. W.; HERMON-TAYLOR, J. Trypsinogen activation peptides assay in the early prediction of severity of acute pancreatitis. **The Lancet**, v. 335, n. 8680, p. 4-8, 1990.

GUKOVSKY, I.; LUGEA, A.; SHAHSAHEBI, M.; CHENG, J. H.; HONG, P. P.; JUNG, Y. J.; DENG, Q.; FRENCH, B. A.; LUNGO, W.; FRENCH, S. W.; TSUKAMOTO, H.; PANDOL, S. J. A rat model reproducing key pathological responses of alcoholic chronic pancreatitis. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 294, p. G68-G79, 2008.

HABER, P. S.; KEOGH, G. W.; APTE, M. V.; MORAN, C. S.; STEWART, N. L.; CRAWFORD, D. H.; PIROLA, R. C.; MCCAUGHAN, G. W.; RAMM, G. A.; WILSON, J. S. Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. **The American Journal of Pathology**, v. 155, p. 1087-1095, 1999.

HAN, S. N.; ADOLFSSON, O.; LEE, C. K.; PROLLA, T. A.; ORDOVAS, J.; MEYDANI, S. N. Age and vitamin E-induced changes in gene expression profiles of T cells. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 6052-6061, 2006.

HASTIER, P.; BUCKLEY, M. J.; FRANCOIS, E.; PETEN, E. P.; DUMAS, R.; CAROLI-BOSC, F. X.; DELMONT, J. P. A prospective study of pancreatic disease in patients with alcoholic cirrhosis: comparative diagnostic value of ERCP and EUS and long-term significance of isolated parenchymal abnormalities. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 49, n. 6, p. 705-709, 1999.

HIETARANTA, A.; MUSTONEN, H.; PUOLAKKAINEN, P.; HAAPIAINEN, R.; KEMPPAINEN, E. Proinflammatory effects of pancreatic elastase are mediated through TLR4 and NF-kappaB. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, p. 192-196, 2004.

ICHIHARA, S.; SATO, M.; KOZUKA, S. Prevalence of pancreatitis in liver diseases of various etiologies: an analysis of 107,754 adult autopsies in Japan. **Digestion**, v. 51, n. 2, p. 86-94, 1992.

JONES, S. A. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. **Journal of Immunology**, v. 175, p. 3463-3468, 2005.

JORDÃO JR, A. A.; MEIRELLES, M. S.; CHIARELLO, P. G.; VANNUCCHI, H. Efeito da administração crônica de etanol sobre a peroxidação lipídica em ratos. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 35, p. 48-52, 2002.

JORDÃO JR, A. A.; CHIARELLO, P. G.; ARANTES, M. R.; MEIRELLES, M. S.; VANNUCCHI, H. Effect of an acute dose of ethanol on lipid peroxidation in rats: action of vitamin E. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 459-464, 2004.

KAGAN, V. E.; SERBINOVA, E. A.; FORTE, T.; SCITA, G.; PACKER, L. Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. **Journal of Lipid Research**, v. 33, p. 385-397, 1992.

KANBAGLI, O.; BALKAN, J.; AYKAC-TOKER, G.; UYSAL, M. Hepatic mitochondrial prooxidant and antioxidant status in ethanol-induced liver injury in rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 11, p. 1482-1484, 2002.

KAWASE, T.; KATO, S. LIEBER, C. S. Lipid peroxidation and antioxidant defense systems in rat liver after chronic ethanol feeding. **Hepatology**, v. 10, p. 815-821, 1989.

KAYDEN, H. J. & TRABER, M. G. Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. Review. **Journal of Lipid Research**, v. 34, p. 343-358, 1993.

KEIM, V.; WILLEMER, S.; IOVANNA, J-L.; ADLER, G.; DAGORN, J-C. Rat pancreatitis-associated protein is expressed in relation to severity of experimental pancreatitis. **Pancreas**, v. 9, n. 5, p. 606-312, 1994.

KEIM, V.; IOVANNA, J-L.; ROHR, G.; USADEL, K. H.; DAGORN, J-C. Purification and partial characterization of a rat pancreatic secretory protein associated with pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 100, p. 775-781, 1991.

KOCH, O. R.; PANI, G.; BORRELLO, S.; COLAVITTI, R.; CRAVERO, A.; FARRE, S.; GALEOTTI, T. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 25, n. 1-2, p. 191-198, 2004.

KOLIOPANOS, A.; FRIESS, H.; KLEEFF, J.; ROGGO, A.; ZIMMERMANN, A.; BUCHLER, M. W. Cyclooxygenase 2 expression in chronic pancreatitis: correlation with stage of the disease and diabetes mellitus. **Digestion**, v. 64, p. 240-247, 2001.

KUBISCH, C. H.; GUKOVSKY, I.; LUGEA, A.; PANDOL, S. J.; KUICK, R.; MISEK, D. E.; HANASH, S. M.; LOGSDON, C. D. Long-term ethanol consumption alters pancreatic gene expression in rats: a possible connection to pancreatic injury. **Pancreas**, v. 33, n. 1, p. 68-76, 2006.

LEO, M. A.; ALEYNIK, S. I.; ALEYNIK, M. K.; LIEBER, C. S. β -carotene beadlets potentiate hepatotoxicity of alcohol. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, p. 1461-1469, 1997.

LERCH, M. M.; ALBRECHT, E.; RUTHENBURGER, M.; MAYERLE, J.; HALANGK, W.; KRUGER, B. Pathophysiology of Alcohol-Induced Pancreatitis. **Pancreas**, v. 27, n. 4, p. 291-296, 2003.

LERCH, M. M.; ADLER, G. Experimental animal models of acute pancreatitis. **International Journal of Pancreatology**, v. 15, n. 3, p. 159-170, 1994.

LI, J.; GUO, M.; HU, B.; LIU, R.; WANG, R.; TANG, C. Does chronic ethanol intake cause chronic pancreatitis? **Pancreas**, v. 37, p. 189-195, 2008.

LI, Y.; ZHOU, Z. G.; XIA, Q. J.; ZHANG, J.; LI, H. G.; CAO, G. Q.; WANG, R.; LU, Y. L.; HU, T. Z. Toll-like receptor 4 detected in exocrine pancreas and the change of expression in cerulein-induced pancreatitis. **Pancreas**, v. 30, p. 375-381, 2005a.

LI, Z.; SOLOSKI, M. J.; DIEHL, A. M. Dietary Factors Alter Hepatic Innate Immune System in Mice With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Hepatology**, v. 42, n. 4, p. 880-885, 2005b.

LI, H-S.; ZHANG, J-Y.; THOMPSON, B. S.; DENG, X-Y.; FORD, M. E.; WOOD, P. G.; STOLZ, D. B.; EAGON, P. K.; WHITCOMB, D. C. Rat mitochondrial ATP synthase ATP5G3: cloning and upregulation in pancreas after chronic ethanol feeding. **Physiological Genomics**, v. 6, p. 91-98, 2001.

LIEBER, C. S. Metabolism of Alcohol. **Clinics in Liver Disease**, v. 9, n. 1, p. 1-35, 2005.

LIEBER, C. S. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. **Alcohol**, v. 34, p. 9-19, 2004.

LIEBER, C. S. Hepatic and metabolic effects of ethanol: Pathogenesis and prevention. **Annals of Medicine**, v. 26, n. 5, p. 325-330, 1994.

LIEBER, C. S. & DECARLI, L. M. Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. **Alcohol and Alcoholism**, v. 24, n. 3, p. 197-211, 1989.

LIEBER, C. S.; JONES, D. P.; DECARLI, L. M. Effects of prolonged ethanol intake: production of fatty liver despite adequate diets. **Journal of Clinical Investigation**, v. 44, p. 1009-1021, 1965.

LIEBER, C. S.; JONES, D. P.; MENDELSON, J.; DECARLI, L. M. Fatty liver, hyperlipemia and hyperuricemia produced by prolonged alcohol consumption, despite adequate dietary intake. **Transactions of the Association of American Physicians**, v. 76, p. 289-300, 1963.

LIN, W. T.; HUANG, C. C.; LIN, T. J.; CHEN, J. R.; SHIEH, M. J.; PENG, H. C.; YANG, S. C.; HUANG, C. Y. Effects of beta-carotene on antioxidant status in rats with chronic alcohol consumption. **Cell Biochemistry and Function**, v. 27, p. 344-350, 2009.

LIN, Y.; HUANG, R.; SANTANAM, N.; LIU, Y. G.; PARTHASARATHY, S.; HUANG, R. P. Profiling of human cytokines in healthy individuals with vitamin E supplementation by antibody array. **Cancer Letters**, v. 187, p. 17-24, 2002.

LOMBA, A.; MILAGRO, F. I.; GARCÍA-DÍAZ, D. F.; MARTI, A.; CAMPIÓN, J.; MARTÍNEZ, J. A. Obesity induced by a pair-fed high fat sucrose diet: methylation and expression pattern of genes related to energy homeostasis. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, p. 60, 2010.

LOMBA, A.; MILAGRO, F. I.; GARCÍA-DÍAZ, D. F.; CAMPIÓN, J.; MARZO, F.; MARTÍNEZ, J. A. A High-Sucrose Isocaloric Pair-Fed Model Induces Obesity and Impairs NDUF6 Gene Function in Rat Adipose Tissue. **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**, v. 2, p. 267-272, 2009.

LÓPEZ, J. M.; BOMBI, J. A.; VALDERRAMA, R.; GIMÉNEZ, A.; PARÉS, A.; CABALLERÍA, J.; IMPERIAL, S.; NAVARRO, S. Effects of prolonged ethanol intake and malnutrition on rat pancreas. **Gut**, v. 38, p. 285-292, 1996.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAIANSKI, N. A.; MAIANSKI, A. N.; KUIJPERS, T. W.; ROOS, D. Apoptosis of neutrophils. **Acta Haematologica**, v. 111, p. 56-66, 2004.

MAIZTEGUI, B.; BORELLI, M. I.; MASSA, M. L.; DEL ZOTTO, H.; GAGLIARDINO, J. J. Enhanced expression of hexokinase I in pancreatic islets induced by sucrose administration. **The Journal of Endocrinology**, v. 189, n. 2, p. 311-317, 2006.

MARTIN, A.; FOXALL, T.; BLUMBERG, J. B.; MEYDANI, M. Vitamin E inhibits low density lipoprotein-induced adhesion of monocytes to human aortic endothelial cells in vitro. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 17, p. 429-436, 1997.

MCDONOUGH, K. H. Antioxidant nutrients and alcohol. **Toxicology**, v. 189, n. 1, pp. 89-97, 2003.

MEYDANI, M. Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1665S-1668S, 2000.

MEYDANI, S. N.; MEYDANI, M.; BLUMBERG, J. B.; LEKA, L. S.; SIBER, G.; LOSZEWSKI, R.; THOMPSON, C.; PEDROSA, M. C.; DIAMOND, R. D.; STOLLAR, B. D. Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects. A randomized controlled trial. **JAMA**, v. 277, p. 1380-1386, 1997.

MEYDANI, M.; SEITZ, H. K.; BLUMBERG, J. B.; RUSSELL, R. M. Effect of chronic ethanol feeding on hepatic and extrahepatic distribution of vitamin E in rats. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v. 15, n. 5, p. 771-774, 1991.

MEYDANI, S. N.; BARKLUND, P. M.; LIU, S.; MEYDANI, M.; MILLER, R. A.; CANNON, J. G.; MORROW, F. D.; ROCKLIN, R.; BLUMBERG, J. B. Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 52, p. 557-563, 1990.

MEYDANI, S. N.; MEYDANI, M.; VERDON, C. P.; SHAPIRO, A. A.; BLUMBERG, J. B.; HAYES, K. C. Vitamin E supplementation suppresses prostaglandin E2 synthesis and enhances the immune response of aged mice. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 34, p. 191-201, 1986.

MONTES, C. G. Aspectos clínicos e morfológicos da pancreatite crônica em uma série de 320 pacientes. 1995. Tese (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

MULLIN, A. E.; SOUKATCHEVA G.; VERCHERE, C. B.; CHANTLER, J. K. Application of in situ ductal perfusion to facilitate isolation of high-quality RNA from mouse pancreas. **BioTechniques**, v. 40, n. 5, p. 617-621, 2006.

NANJI, A. A.; TSUKAMOTO, H.; FRENCH, S. W. Relationship between fatty liver and subsequent development of necrosis, inflammation and fibrosis in experimental alcoholic liver disease. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 51, n. 2, p. 141-148, 1989.

National Academy Press. **Nutrient Requirements of Laboratory Animals**. 4th edition, Washington DC, 1995.

NIKI, E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, p. 1119S – 1124S, 1991.

NORTON, I. D.; APTE, M. V.; DIXSON, H.; TRENT, R. J.; HABER, P. S.; PIROLA, R. C.; WILSON, J. S. Cystic fibrosis genotypes and alcoholic pancreatitis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, p. 496-499, 1998.

NORTON, I. D.; APTE M. V.; HABER, P. S.; MCCAUGHAN, G. W.; PIROLA, R. C.; WILSON, J. S. Cytochrome P450E1 is present in rat pancreas and is induced by chronic ethanol administration. **Gut**, v. 42, p. 426-430, 1998.

OLIVEIRA, G. R. DE; SANKARANKUTTY, A. K.; CASTRO E SILVA, O.; FERREIRA, J.; KURACHI, C.; ZUCOLOTO, S.; VANNUCCHI, H.; JORDÃO JR., A. A.; MARCHINI, J. S.; BAGNATO, V. S. Fluorescence spectroscopy to diagnose hepatic steatosis in a rat model of fatty liver. **Liver International**, v. 29, n. 3, p. 331-336, 2009.

OLSZEWER, E. Bioquímica dos radicais livres e doenças degenerativas crônicas. 54 páginas. 2009. Disponível em: <http://www.clinicamasquelier.com.py/pdf/bioquimica_dos_radicais_Libres_dr_efrain_olszewer.pdf> [acessado em setembro de 2010]

ORELLE, B.; KEIM, V.; MASCLOTRA, L.; DAGORN, J-C.; IOVANNA, J-L. Human Pancreatitis-associated Protein. Messenger RNA Cloning and Expression in Pancreatic Diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 90, p. 2284-2291, 1992.

OZER, N. K.; BOSCOBOINIK, D.; AZZI, A. New roles of low density lipoproteins and vitamin E in the pathogenesis of atherosclerosis. **Biochemistry & Molecular Biology International**, v. 35, p. 117-124, 1995.

PACKER, J. E.; SLATER, T. F.; WILSON, R. L. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. **Nature**, v. 278, p. 737-738, 1979.

PAGLIUSO, R. G.; GOLONI-BERTOLLO, E. M.; ABBUD FILHO, M.; PAVARINO-BERTELLI, E. C. Estresse oxidativo e disfunção crônica do enxerto renal. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 13, n. 4, p. 223-227, 2006.

PANDOL, S. J.; PERISKIC, S.; GUKOVSKY, I.; ZANINOVIC, V.; JUNG, Y.; ZONG, Y.; SOLOMON, T. E.; GUKOVSKAYA, A. S.; TSUKAMOTO, H. Ethanol diet increases the sensitivity of rats to pancreatitis induced by cholecystokinin octapeptide. **Gastroenterology**, v. 117, n. 3, p. 706-716, 1999.

PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LOPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 617-629, 2004.

PERIDES, G.; TAO, X.; WEST, N.; SHARMA, A.; STEER, M. L. A mouse model of ethanol dependent pancreatic fibrosis. **Gut**, v. 54, p. 1461-1467, 2005.

PERKINS, P. S.; RUTHERFORD, R. E.; PANDOL, S. J. Effect of chronic ethanol feeding on digestive enzyme synthesis and mRNA content in rat pancreas. **Pancreas**, v. 10, n. 1, p. 14-21, 1995.

PFÜTZER, R. H.; TADIC, S. D.; LI, H. S.; THOMPSON, B. S.; ZHANG, J. Y.; FORD, M. E.; EAGON, P. K.; WHITCOMB, D. C. Pancreatic cholesterol esterase, ES-10, and fatty acid ethyl ester synthase III gene expression are increased in the pancreas and liver but not in the brain or heart with long-term ethanol feeding in rats. **Pancreas**, v. 25, n. 1, p. 101-106, 2002.

PUROHIT, V.; RUSSO, D.; SALIN, M.; BROWN, R. Mechanisms of Alcoholic Pancreatitis: Introduction and Summary of the Symposium. **Pancreas**, v. 27, n. 4, p. 281-285, 2003.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet. **Journal of Nutrition**, v. 127, p. 838S-841S, 1997.

RIDKER, P. M.; HENNEKENS, C. H.; ROITMAN-JOHNSON, B.; STAMPFER, M. J.; ALLEN, J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. **Lancet**, v. 351, p. 88-92, 1998.

SADRZADEH, S. M. H. NANJI, A. A.; MEYDANI, M. Effect of chronic ethanol feeding on plasma and liver α -and- γ -tocopherol levels in normal and vitamin E deficient rats. **Biochemical Pharmacology**, v. 47, p. 2005-2010, 1994.

SAS Institute Inc.. *SAS/STAT® User's Guide, Version 9,1*, Cary, NC: SAS Institute Inc, 1999.

SCHLOSSER, W.; SCHLOSSER, S.; RAMADANI, M.; GANSAUGE, F.; GANSAUGE, S.; BEGER, H. G. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in chronic pancreatitis. **Pancreas**, v. 25, p. 26-30, 2002.

SCHNEIDER, E.; SCHMID-KOTSAS, A.; ZHAO, J.; WEIDENBACH, H.; SCHMID, R. M.; MENKE, A.; ADLER, G.; WALTENBERGER, J.; GRUNERT, A.; BACHEM, M. G. Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**, v. 281, p. C532-C543, 2001.

SEDLAK, J. & LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein bound, and nonprotein sulgydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.

SIQUEIRA-SILVA, C. Análise da expressão gênica em modelo experimental de alcoolismo crônico: provável resposta adaptativa à hepatotoxicidade alcoólica. 2010. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica. Área de concentração: Investigação Biomédica), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SPOLARICS, Z. A Carbohydrate-Rich Diet Stimulates Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Expression in Rat Hepatic Sinusoidal Endothelial Cells. **The Journal of Nutrition**, v. 129, n. 1, p. 105-108, 1999.

STEINER, M. Influence of vitamin E on platelet function in humans. **Journal of The American College of Nutrition**, v. 10, p. 466-473, 1991.

STROLE JR., W. E. & VICKERY JR., A. L. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 40-1975. **The New England Journal of Medicine**, v. 293, n. 15, p. 764-769, 1975.

TYOPPONEN, J. T. & LINDROS, K. O. Combined vitamin E deficiency and ethanol pretreatment: liver glutathione and enzyme changes. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 56, n. 3, p. 241-245, 1986.

VASU, V. T.; HOBSON, B.; GOHIL, K.; CROSS, C. E. Genome-wide screening of alpha-tocopherol sensitive genes in heart tissue from alpha-tocopherol transfer protein null mice (ATTP(-/-)). **FEBS Letters**, v. 581, p. 1572-1578, 2007.

WILSON, J. S. & APTE, M. V. Role of Alcohol Metabolism in Alcoholic Pancreatitis. **Pancreas**, v. 27, n. 4, p. 311-315, 2003.

WORK GROUP III. Diseases of the pancreas. **Gastroenterology**, v. 69, n. 5, p. 1088-1094, 1975.

WU, D.; MARTIN, K. R.; MEYDANI, S. N.; MEYDANI, M. Effect of Vitamin E on expression of cell surface adhesion molecules and PGI₂ production by human aortic endothelial cells (HAEC). **The FASEB Journal**, v. 10, p. A449 (abstract), 1997.

ZANUTO, M. E. Efeito da suplementação com β -caroteno sintético no DNA e no metabolismo de células hepáticas de ratos recebendo etanol. 2005. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos e Nutrição Experimental), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

ZENILMAN, M. E. E.; TUCHMAN, D.; ZHENG, Q.; LEVINE, J.; DELANY, H. Comparison of reg I and reg III levels during acute pancreatitis in the rat. **Annals of Surgery**, v. 232, p. 646-652, 2000.

ZHANG, H.; KANDIL, E.; LIN, Y. Y.; LEVI, G.; ZENILMAN, M. E. Targeted inhibition of gene expression of pancreatitis-associated protein exacerbates the severity of acute pancreatitis in rats. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 39, n. 9, p. 870-881, 2004.

ZINGG, J-M. Vitamin E: An overview of major research direction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 28, p. 400-422, 2007a.

ZINGG, J-M. Modulation of signal transduction by vitamin E. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 28, p. 481-506, 2007b.

ZINGG, J-M. Molecular and Cellular Activities of Vitamin E Analogues. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 545-560, 2007c.

Anexo

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 005/2009, sobre o projeto intitulado “*Análise da expressão gênica de marcadores inflamatórios em modelo animal de pancreatite alcoólica crônica mediante suplementação com vitamina E*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Hélio Vannucchi** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **16 de fevereiro de 2009**.

(We certify that the protocol nº 005/2009, about “*Analysis of pancreatic gene expression of inflammatory markers in alcoholic chronic pancreatitis animal model under vitamin E supplementation*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in **02/16/2009** meeting).

Ribeirão Preto, 16 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal