

ESTER CORREIA SARMENTO RIOS

Efeito da solução hipertônica (NaCl 7,5%) no estresse
oxidativo e nos processos de morte celular e
remodelamento tecidual hepático em pancreatite aguda
experimental

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Emergências Clínicas
Orientador: Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano

São Paulo
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ESTER CORREIA SARMENTO RIOS

Efeito da solução hipertônica (NaCl 7,5%) no estresse
oxidativo e nos processos de morte celular e
remodelamento tecidual hepático em pancreatite aguda
experimental

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Emergências Clínicas
Orientador: Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano

São Paulo
2010

*Aos meus pais por me ensinarem a
verdadeira sabedoria*

AGRADECIMENTOS

A Deus, digno de todo louvor e honra, dEle, a Ele e por meio dEle são todas as coisas.

Ao Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano, por me aceitar como aluna, pela orientação, apoio, compreensão, paciência, confiança e respeito.

Ao Prof. Dr. Irineu Tadeu Velasco, por me receber no laboratório, concedendo uma grande oportunidade, pelo apoio e confiança.

Ao Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza, pela oportunidade, atenção, ensinamentos, respeito e apoio.

À Dra. Ana Lochabel Soares Moretti por ter sido mais que uma extensão universitária com seus ensinamentos, pelo seu brilhantismo, pela amizade, pelo companheirismo e por mostrar na prática como ser, de fato, uma pesquisadora.

Aos meus pais, Samuel e Neide, pelo imenso amor e dedicação, por me ensinarem O caminho, por me ensinarem a ter coragem e humildade na luta por um sonho, pela paciência com minha personalidade, por serem exemplo em todos os aspectos da vida.

Aos meus irmãos, André e Heloisa, pelo amor, pelo apoio, pela descontração, por me ajudarem nos problemas e compartilharem alegrias, por acreditarem em mim, pela paciência enorme, por sermos uma equipe sempre e para sempre.

Aos meus avós, Ruben e Eva, à minha tia Nilza e meus primos, Liziara e Daniel, por torcerem por mim, me apoiarem e se alegrarem comigo.

Às minhas grandes amigas Jeniffer, Monaly, Nauê, Noemih, Patrícia e Sandra pelo carinho, apoio e amizade, por dividirem angústias, alegrias e lições de vida.

Às queridíssimas amigas Cristiane Jurado e Nancy Canavesi, por transformarem o ambiente com alegria, amizade, companheirismo, gargalhadas, café e filosofia.

Aos amigos que passaram ou ainda estão no LIM51, por participaram da construção dessa tese compartilhando conhecimento, ajuda e amizade.

À Vera Pontieri que orientou meus primeiros passos na pesquisa.

À Fátima Abatepaulo pela atenção na realização da histologia.

À Suely Ariga e Márcia Koike pelo apoio e por me ensinarem a técnica de leitura de lâminas histológicas.

À Denise, Geraldo, Hermes, Kelly e Thaís pela ajuda no laboratório.

À Rose e Angélica por me ajudarem com a terrível burocracia.

Ao Coral Universitário Mackenzie pelos momentos de paz.

A todos os meus amigos, dos lugares onde vivi, da faculdade, da pós-graduação, dos cursos, do coral, da igreja, amigos de amigos, parentes, etc., que deixaram um pouquinho de si, contribuindo nessa caminhada.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria, revelam prudência todos os que o praticam.”

SALMO 111:10

"Pensar apenas ou desejar somente nunca levou ninguém a lugar nenhum. É necessário também ação."

Shakespeare

SUMÁRIO

Lista de Figuras	
Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas	
Resumo	
Abstract	
1. Introdução	1
1.1. Pancreatite	1
1.2. Lesão Hepática na Pancreatite Aguda	3
1.3. Estresse Oxidativo	4
1.4. Apoptose	7
1.5. Remodelamento Tecidual	9
1.6. Metaloproteinases (MMPs)	11
1.7. <i>Heat Shock Proteins</i> (HSPs)	14
1.8. Solução Hipertônica	15
2. Objetivos	20
3. Metodologia	23
3.1. Indução de Pancreatite	23
3.2. Análise da Expressão Gênica - RT-PCR	24
3.3. Análise da Expressão Protéica - Western Blot	26
3.4. Análise da Atividade de Metaloproteinases - MMP2 e -9 – Zimografia	28
3.5. Marcação de Nitrotirosina - Imunohistoquímica	30
3.6. Análise da Peroxidação Lipídica - TBARS	31
3.7. Dosagem de Nitrito/Nitrato - Reação de Griess	31
3.8. Quantificação de Citocinas - ELISA	32
3.9. Análise da ALT (Alaninoaminotransferase)	34
3.10. Análises Estatísticas	34
4. Resultados	36
4.1. Estresse Oxidativo	37
4.1.1. Citocinas Hepáticas	37

4.1.2 Citocinas Plasmáticas	38
4.1.3. Peroxidação Lipídica	39
4.1.4. Alaninoaminotrasferase (ALT)	39
4.1.5. Expressão gênica e protéica de iNOS	40
4.1.6. Dosagem de Nitrito e Nitrato	40
4.1.7. Nitrotirosina	41
4.1.8. Expressão de <i>Heat Shock Protein</i> - HSP60	41
4.1.9. Expressão de <i>Heat Shock Protein</i> – HSP70	42
4.1.10. Expressão de <i>Heat Shock Protein</i> – HSP90	42
4.2. Apoptose	43
4.2.1. Expressão protéica de Caspase-2	43
4.2.2. Expressão protéica de APAF-1 e AIF	43
4.2.3. Expressão protéica de Caspase-7	44
4.3. Remodelamento Tecidual	44
4.3.1. Expressão e Atividade de Metaloproteinase 2 (MMP-2)	44
4.3.2. Expressão e Atividade de Metaloproteinase 9 (MMP-9)	45
4.3.3. Expressão de colágeno tipo I e tipo III	45
4.3.4. Expressão de <i>Heat Shock Protein</i> – HSP47	46
5. Figuras	48
6. Discussão	66
7. Conclusões	77
8. Referências Bibliográficas	79
9. Anexo	
Artigo publicado no <i>Journal of Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology</i> – Hypertonic saline reduces metalloproteinase expression in liver during pancreatitis	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Eventos intra- e extra-pancreáticos na pancreatite aguda	2
Figura 2: Perfil de expressão de NOS durante a PA	7
Figura 3: Vias intrínseca e extrínseca da apoptose	9
Figura 4: Estrutura Geral das Metaloproteinases (MMPs)	14
Figura 5: Citocinas Hepáticas	49
Figura 6: Citocinas Plasmáticas	50
Figura 7: Peroxidação Lipídica	51
Figura 8: Atividade de Alaninoaminotransferase (ALT)	52
Figura 9: Expressão gênica e protéica de iNOS	53
Figura 10: Produção de Nitrito/Nitrato	54
Figura 11: Expressão de Nitrotirosina	55
Figura 12: Expressão gênica e protéica de HSP60	56
Figura 13: Expressão gênica e protéica de HSP70	57
Figura 14: Expressão gênica e protéica de HSP90	58
Figura 15: Expressão protéica de Caspase-2	59
Figura 16: Expressão protéica de APAF-1 e AIF	60
Figura 17: Expressão protéica de Caspase-7	61
Figura 18: Expressão e atividade de MMP-2	62
Figura 19: Expressão e atividade de MMP-9	63
Figura 20: Expressão protéica dos colágenos tipos I e III	64
Figura 21: Expressão de HSP47 e correlação com MMP-9	65

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

μg	Micrograma
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μm^2	Micrômetros quadrados
AIF	do inglês " <i>Apoptosis-Inducing Factor</i> " traduzido por fator indutor de apoptose
AKT	do inglês " <i>Tyrosine Kinase A</i> "
APAF-1	do inglês " <i>Apoptotic protease activating factor 1</i> " traduzido por Fator Apoptótico Ativador de Protease
ALT	do inglês " <i>Alanine Aminotransferase</i> " traduzido por Alanina aminotransferase
BSA	do inglês " <i>Bovine Serum Albumin</i> " traduzido como Albumina Sérica Bovina
Ca^{2+}	íon Cálcio
CaCl_2	Cloreto de Cálcio
CCK	do inglês " <i>Cholecystokinin</i> " traduzido como Colecistocinina
CEH	Células Estelares Hepáticas
cDNA	do inglês " <i>Complementary DNA</i> " traduzido como DNA complementar
DNA	do inglês " <i>Deoxyribonucleic Acid</i> " traduzido como Ácido desoxirribonucléico

dNTP	do inglês " <i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i> " traduzido como Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DO	Densidade Óptica
EDTA	do inglês " <i>Ethylenediamine-tetra acetic acid</i> " traduzido como Ácido etilenodiamino tetra acético
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
HCl	Ácido Clorídrico
HSPs	do inglês " <i>Heat Shock Proteins</i> " traduzido como Proteínas Ativadas por Choque Térmico
ICAM-1	do inglês " <i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i> " traduzido como Molécula de adesão intercelular-1
IFN- γ	Interferon – gama
IL	Interleucina
kDA	Kilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MAPK	do inglês " <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> " traduzido como proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	Matriz Extracelular
mg	Miligramas
mg/ml	Miligramas por mililitros
Mg ²⁺	íon Magnésio
MM	Milimolar

MMPs	do inglês <i>"Matrix Metalloproteinases"</i> traduzido por Metaloproteinases de matriz
MOF	do inglês <i>"Multiple Organ Failure"</i> traduzido como Falência de Múltiplos Órgãos.
MT-MMP	do inglês <i>"Membrane-type Matrix Metalloproteinases"</i> traduzido como Metaloproteinases tipo membrana
NaCl	Cloreto de Sódio
NaN ₃	Azida Sódica
NF-κB	do inglês <i>"Nuclear transcription factor-kappaB"</i>
NO	do inglês <i>"Nitric Oxide"</i> , traduzido por Óxido Nítrico
eNOS	do inglês <i>"Endothelial Nitric Oxide Synthase"</i> traduzido por Óxido Nítrico Sintase Endotelial
iNOS	do inglês <i>"Inducible Nitric Oxide Synthase"</i> traduzido por Óxido Nítrico Sintase Induzível
nNOS	do inglês <i>"Neuronal Nitric Oxide Synthase"</i> traduzido por Óxido Nítrico Sintase Neuronal
PA	Pancreatite Aguda
PAF	do inglês <i>"Platelet Activating Factor"</i> traduzido como Fator Ativador de Plaquetas
Pb	Pares de bases
PBS	do inglês <i>"Phosphate-buffered saline"</i> traduzido como tampão salina fosfato
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PH	cologarítimo da concentração hidrogeniônica de uma solução

PI3P	do inglês " <i>Phosphoinositol-3-kinase phosphorylated</i> "
PMN	Polimorfonuclear
Pmol	Picogramas por Mol
PMSF	do inglês " <i>Phenylmethylsufonil fluoride</i> "
RNA _m	RNA mensageiro
RRNA	do inglês " <i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i> " traduzido como ácido ribonucléico ribossomal
RT-PCR	do inglês " <i>Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction</i> " traduzido como Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase.
SDS page	do inglês " <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> " traduzido como eletroforese em gel de poliacrilamida, tendo como agente denaturante sulfato dodecil sódico.
SH	Solução Hipertônica
SIRS	do inglês " <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> " traduzido como Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
TBARS	do inglês " <i>Thiobarbituric Reactive Substances</i> " traduzido como Substâncias que reagem com o Ácido Tiobarbitúrico
TBST	do inglês " <i>Tris-Buffered Saline Tween 20</i> " traduzido como tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20
TEMED	Tetrametiletlenonodiamino
TGF- β	do inglês " <i>Transforming Growth Factor</i> "
TIMP	do inglês " <i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i> " traduzido por

Inibidor Tecidual de Metaloproteinases

TNF	do inglês " <i>Tumor Necrosis Factor-α</i> " traduzido como fator de necrose tumoral
TXA2	Tromboxano A2
Zn ²⁺	íon Zinco

RESUMO

Rios, ECS. Efeito da solução hipertônica (NaCl 7,5%) no estresse oxidativo e nos processos de morte celular e remodelamento tecidual hepático em pancreatite aguda experimental. [tese]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2010. 106 pgs.

Lesão hepática é uma das complicações decorrentes de pancreatite aguda (PA) e mostra uma correlação positiva com a gravidade da doença. Recentemente foi demonstrado que tratamento com solução hipertônica (SH) reduz inflamação e mortalidade na PA. O presente trabalho investigou os efeitos de SH na modulação do estresse oxidativo, apoptose e remodelamento tecidual no fígado durante a PA. Ratos machos foram divididos em quatro grupos: C – animais que não foram submetidos à PA ou tratamento; past – animais submetidos à indução de PA e que não receberam tratamento; pas – animais submetidos à PA e tratados com solução fisiológica (NaCl 0.9%); pah – animais submetidos à indução de PA e que receberam SH (NaCl 7.5%). PA foi induzida pela injeção retrógrada de ácido taurocólico (2.5%) no ducto biliar-pancreático. Após 4, 12 e 24 horas os animais foram sacrificados para coleta das amostras de interesse (fígado e plasma) submetidas a ensaios para análise de expressão (western blot e PCR) de Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS), metaloproteinases (MMP) -2 e -9, *Heat Shock Protein* (HSP) 47, 60, 70 e 90, colágenos tipos I e III, caspases 2 e 9, APAF-1 e AIF, formação de nitrotirosina (imunohistoquímica), peroxidação lipídica (TBARs), atividade de alaninoaminotransferase (ALT), produção de nitrito/nitrato (Reação de Griess) e das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 (ELISA). O tratamento com SH reduziu significativamente o estresse oxidativo hepático com a redução da expressão gênica de iNOS ($p < 0,01$ vs. pas), dos níveis de nitrito/nitrato ($P < 0,01$ vs. pas), liberação de ALT ($p < 0,01$ vs. pas) e inibição da formação de peroxinitrito após 12 horas da indução de PA. Conseqüentemente, a expressão de HSP70 não foi ativada devido à proteção hepática causada pela administração de SH. A expressão e atividade de MMP-9 aumentaram significativamente nos grupos pas e past, entretanto o tratamento com SH manteve os níveis basais ($p < 0,05$ vs. past, pas). Aumento da expressão de HSP47 e alterações na expressão de colágeno indicaram intenso remodelamento de matriz extracelular nos grupos não tratados ou tratados com solução fisiológica, permanecendo semelhante ao controle no grupo pah. Não ocorreram mudanças significativas na expressão das proteínas envolvidas no processo apoptótico. A SH diminuiu o estresse oxidativo no período crítico da PA, resultando na diminuição da lesão hepática e do remodelamento tecidual, mantendo dessa forma a integridade de matriz extracelular.

Descritores: pancreatite, fígado/lesões, solução salina hipertônica, estresse oxidativo, metaloproteases

ABSTRACT

Rios, ECS. Effect of hypertonic saline solution (NaCl 7.5%) on oxidative stress, apoptosis and hepatic tissue remodeling during acute pancreatitis. [thesis]; "Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo"; 2010. 106pgs.

It has been shown an hepatic injury following pancreatitis and a positive correlation with severity of the disease. Hypertonic Solution (HS) reduced morbidity and mortality in experimental pancreatitis. We hypothesize that hypertonic solution resuscitation of acute pancreatitis (AP) may exert anti-inflammatory effects by modulating hepatic oxidative stress, apoptosis and matrix extracellular remodeling in liver. Wistar rats were divided in four groups: C- control animals not subjected to insult or treatment; NT- subjected to pancreatitis induction and receiving no treatment; NS- subjected to pancreatitis induction and receiving normal saline (0.9% NaCl); HS- subjected to pancreatitis induction and receiving hypertonic saline (7.5% NaCl). AP was induced by retrograde infusion of 2,5% sodium taurocholate into the pancreatic duct transduodenally. At 4, 12 and 24 h following pancreatitis induction, liver tissue samples were assayed in order to analyse expression of metalloproteinases (MMPs) -2 and -9, iNOS, collagens (type I and III), Heat Shock Proteins (HSPs) 47, 60, 70 and 90, caspases -2 and -7, APAF-1 and AIF, production of the cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10, Nitrite/nitrate and ALT, Lipid peroxidation and formation of Nitrotyrosine. Hypertonic solution resuscitation significantly modulates the oxidative stress in liver by reduction of iNOS gene expression ($p < 0,01$ vs. NS), nitrite and nitrate levels ($p < 0,01$ vs. NS), lipid peroxidation ($p < 0,05$ vs. NT), ALT release ($p < 0,01$ vs. NS) and peroxinitrite inhibition after 12 hours of pancreatitis induction. Consequently, the HSP70 production has not been activated due to the hypertonic solution effect in hepatic protection. At 4 h and 12 h, MMP-9 expression and activity increased in the NS and NT groups, although remaining at basal levels in the HS group ($p < 0.05$ vs. past, pas). At 12 h, MMP-2 expression increased in the NS group ($p < 0.05$ vs. c) but not in the HS group. At 4 h after pancreatitis induction, HSP47 expression increased in the NS and NT groups. Greater extracellular matrix remodelling occurred in the NS and NT groups than in the HS group, probably as a result of the hepatic wound-healing response to repeated injury. However, the collagen content in hepatic tissue remained at basal levels in the HS group. The proteins involved in apoptosis remained unchanged in all groups. Hypertonic saline is hepatoprotective, since it decreases oxidative stress in the critical time resulting in diminished liver damage, reducing hepatic remodelling, maintaining the integrity of the hepatic extracellular matrix during pancreatitis. Hypertonic saline-mediated regulation of MMP expression might have clinical relevance in pancreatitis-associated liver injury.

Descriptors: pancreatitis, liver/injuries, hypertonic saline solution, oxidative stress, metalloproteases

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. PANCREATITE

A pancreatite aguda (PA) é um processo autodigestivo que resulta em uma inflamação do pâncreas caracterizada por edema, infiltração de leucócitos, hemorragia e necrose celular ¹. Dentre a etiologia variada da doença, as causas mais comuns são alcoolismo e cálculo biliar ², fatores de risco cujo aumento vem determinando a progressão da incidência de pancreatites ³. Clinicamente um quadro de pancreatite é definido como agudo se o paciente torna-se assintomático na evolução, enquanto na pancreatite crônica há persistência da dor ou insuficiência exócrina ou endócrina ⁴.

Nas pancreatites surgem complicações locais e à distância ou sistêmicas, que modificam e agravam a evolução da doença ^{5,6}. A morbidade e mortalidade associadas são atribuídas à exacerbação da resposta do sistema inflamatório e à subsequente disfunção de órgãos distantes como rins, pulmão e fígado ⁷⁻⁹.

Os eventos intra- e extra-pancreáticos envolvidos na PA criam um quadro complexo da doença (Figura 1). A patogênese da PA se inicia por uma ativação inapropriada do tripsinogênio em tripsina que, por sua vez, ativa outras enzimas responsáveis pela autodigestão do pâncreas e que podem extravasar para a cavidade abdominal ¹⁰, levando à liberação de citocinas, ativação do sistema complemento, coagulação e fibrinólise ^{11,12}. A

liberação de citocinas ativa a cascata inflamatória, acarretando no aumento de moléculas de adesão, migração de neutrófilos, produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e outras moléculas inflamatórias, como derivados do ácido araquidônico (PGE2, TXA2), fator ativador de plaqueta (PAF), peptídeo vasoativo, aminas e uma variedade de produtos derivados do complemento ¹³ que culminarão na Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) ¹⁴⁻¹⁶.

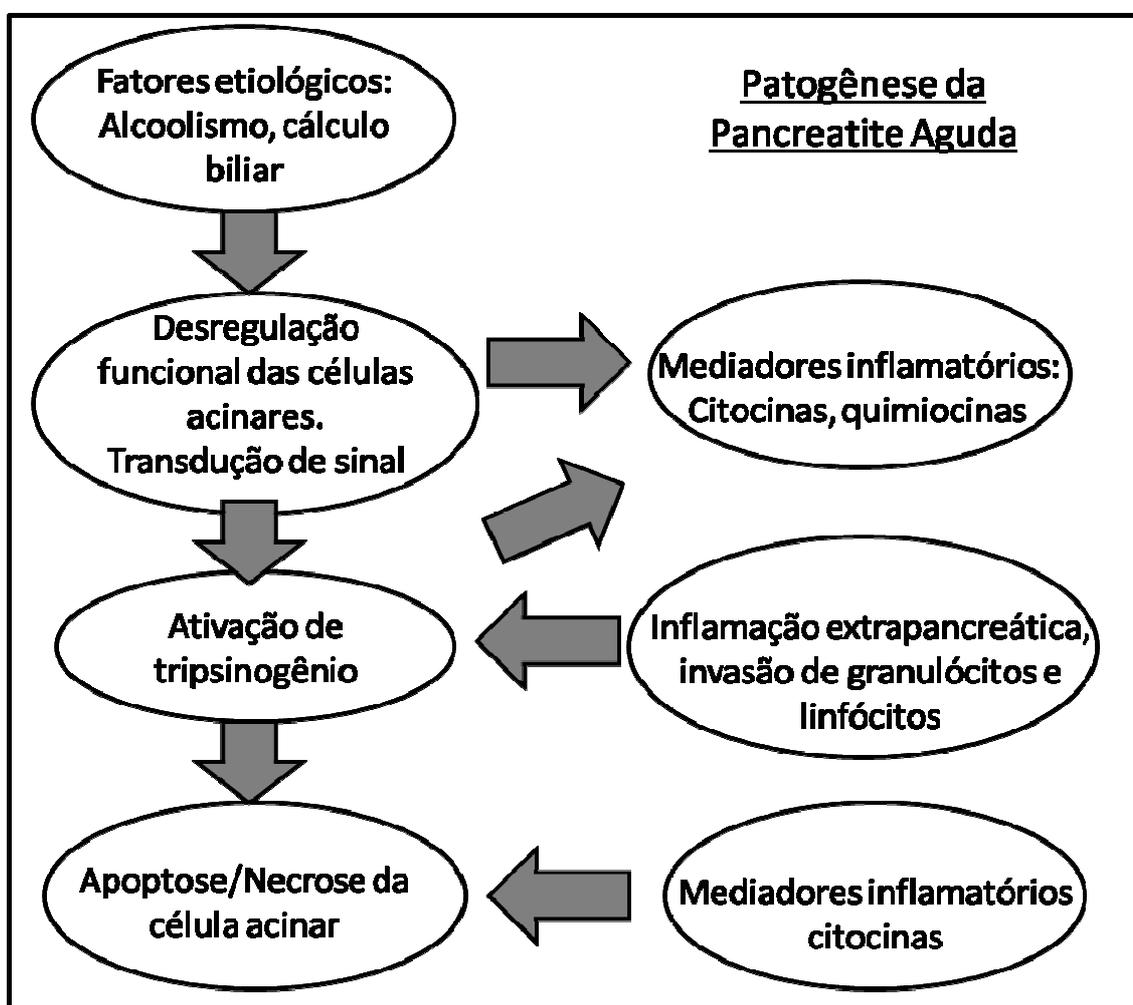


Figura 1: Eventos intra- e extra-pancreáticos na pancreatite aguda. Após o início da fisiopatologia com a ativação inapropriada das células acinares, mediadores inflamatórios sinalizam a resposta extra-pancreática. Os processos intra- e extra-pancreáticos interagem contribuindo para a evolução da doença.

1.2. LESÃO HEPÁTICA NA PANCREATITE AGUDA

A lesão hepática é uma manifestação da resposta do sistema inflamatório durante a PA e um importante indicador prognóstico do quadro clínico geral ¹⁷⁻²⁰.

As modificações histológicas observadas no fígado durante a pancreatite, como necrose focal, hemorragia, congestão de capilares intralobulares, edema dos espaços de Disse e dissociação de cordões hepáticos ^{21,22} devem-se à íntima relação anatômica entre este órgão e o pâncreas, uma vez que ambos se desenvolvem embriologicamente como uma evaginação glandular do intestino primitivo ^{21,23}. Além disso, o sangue venoso do pâncreas é drenado para o sistema porta hepático ^{21,22,24}.

A lesão hepática associada à PA é mediada por citocinas inflamatórias que são largamente produzidas por macrófagos residentes no tecido, as células de Kupffer ¹⁹. A resposta inflamatória da PA desencadeia a ativação de neutrófilos, através de citocinas, como Fator de Necrose Tumoral (TNF- α), e de enzimas, como a tripsina pancreática ^{25,26}. O neutrófilo passa a se ligar ao endotélio de diversos territórios vasculares que estão ativados. À medida que o neutrófilo invade o tecido, estas células secretam elastases, que digerem o tecido e ativam algumas metaloproteinases teciduais (MMPs), que por sua vez, amplificam a digestão de proteínas da matriz extracelular (MEC) ⁵.

Na PA, a lesão hepática, além de seu dano local, participa da produção da lesão pulmonar. As substâncias liberadas pelo pâncreas, como

enzimas proteolíticas e substâncias oxidantes, podem ativar as células hepáticas e estas sintetizarem mediadores inflamatórios responsáveis pelo início do processo inflamatório em outros órgãos ²⁷.

1.3. ESTRESSE OXIDATIVO

Independente da causa inicial da pancreatite, estresse oxidativo é proposto como causa essencial na progressão da destruição do parênquima pancreático ²⁸. Além disso, esse desequilíbrio redox está intrinsecamente envolvido na lesão hepatocelular e subsequente fibrose em muitas doenças hepáticas ²⁹.

Dentre as alterações hepáticas decorrentes da PA, foi demonstrado o efeito depressor de amostras de líquido ascítico de animais com PA sobre o consumo de oxigênio de células hepáticas ³⁰.

EROs derivadas de neutrófilos podem induzir estresse oxidativo intracelular nos hepatócitos, desencadeando necrose celular em menos de uma hora e promovem inflamação por ativarem a transcrição de NF-kB, que controla a produção de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. Além disso, produtos da peroxidação lipídica são altamente quimiotáticos e podem ser responsáveis pela amplificação da lesão ³¹.

As citocinas liberadas regulam a transcrição de diversos genes no hepatócito incluindo óxido nítrico sintase (NOS) ^{31,32} enzima envolvida entre outros eventos, na viabilidade celular e apoptose ³³. TNF- α e Interleucina -6

(IL-6) sozinhas não são suficientes para ativar transcrição de NOS, mas quando combinadas, essas duas citocinas aumentam a transcrição da enzima ³². IL-10 é bem caracterizada por suprimir a função dos macrófagos além de inibir a produção de NO induzido por Interferon-gama (IFN- γ) em macrófagos peritoneais ³³. *In vitro*, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e lipopolissacarídeo (LPS) atuam sinergicamente na expressão de NOS nos hepatócitos ³⁴.

As isoformas de NOS são categorizadas como constitutivas ou dependentes de cálcio e calmodulina. A NOS_n é uma NOS constitutiva de neurônios com aproximadamente 165kDa, também denominada NOS1. A NOS constituinte de endotélio é denominada eNOS ou NOS3 e tem aproximadamente 150 kDa. A iNOS ou NOS2 é a induzível ou cálcio independente, tem aproximadamente 130kDa e é regulada primeiramente em nível transcricional ³⁴.

As NOS catalisam a síntese de óxido nítrico (NO) a partir do aminoácido L-arginina ³⁵. Nos neurônios periféricos que inervam músculo liso, NO é o neurotransmissor não-adrenérgico, não-colinérgico responsável pelo relaxamento do músculo. eNOS é expressa no endotélio vascular, onde o NO é o fator derivado de endotélio que regula pressão sanguínea por relaxar os músculos adjacentes às células musculares lisas. A expressão de iNOS é induzida nos macrófagos quando eles são ativados durante a resposta inflamatória, sendo o NO um dos componentes tóxicos produzidos por células fagocitárias para matar patógenos ³⁴.

As isoformas de NOS apresentam diferentes perfis de expressão e impacto na patogênese da inflamação pancreática, resumidos na Figura 2.

Espécies reativas de nitrogênio (ERNs) produzidas constitutivamente são responsáveis por regular a secreção da porção exócrina do pâncreas e podem proteger contra a pancreatite ³⁶. Os níveis normais de ERNs exercem efeitos benéficos como aumento do fluxo microcirculatório ³⁷, inibição da adesão leucocitária ³⁸ e supressão de Catepsina B, que é crucial na ativação do tripsinogênio ³⁹. Por outro lado, a superexpressão de iNOS e a grande produção de NO durante a PA pode levar à ativação da cascata inflamatória, levando à inibição da respiração celular, nitrosilação e nitração de proteínas resultando na morte celular por necrose e apoptose ³⁹⁻⁴¹.

Nas células dos mamíferos o NO parece prover efeitos citoprotetores contra insultos químicos por agentes que geram estresse oxidativo ³³. Este efeito antioxidante pode ser importante para minimizar lesão tecidual nos processos dependentes de espécies reativas de oxigênio. O NO pode ser estocado na sua forma ativa e sua concentração nos tecidos pode contribuir para imunidade regulada através da atividade de NOS ³⁴. No fígado, as células de Kupffer ativadas são importantes na formação de NO e superóxido, e os hepatócitos e as Células Estelares Hepáticas (CEH) também expressam iNOS ³¹.

Estudos sugerem que expressão de iNOS aumenta a lesão hepatocelular no choque hemorrágico e na lesão de isquemia/reperfusão, sob condições de estresse oxidativo. Entretanto, em condições normais, na ausência de estresse oxidativo, o NO protege contra a apoptose ³³.

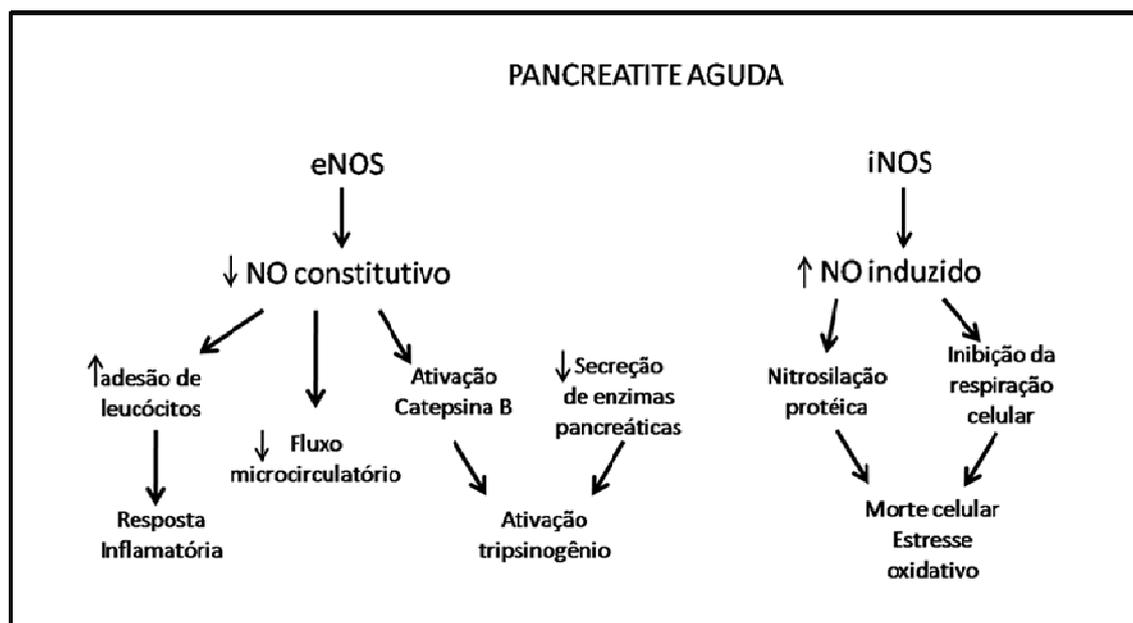


Figura 2: Diferença no perfil de expressão de NOS durante a PA. eNOS é depletada durante PA, levando à diminuição do fluxo microcirculatório e supressão da secreção pancreática, aumento da adesão leucocitária e ativação de tripsinogênio. iNOS é super-expressa resultando em morte celular e estresse oxidativo.

1.4. APOPTOSE

As substâncias tóxicas liberadas sistemicamente durante a PA, como EROs, NO e citocinas, interferem na respiração mitocondrial e podem induzir apoptose em múltiplos órgãos, incluindo o fígado ⁴².

As caspases são as executoras da morte celular programada, causando apoptose pela clivagem de diferentes proteínas-alvo, como inibidores de DNase. Além disso, as caspases levam à fragmentação do núcleo e de proteínas do citoesqueleto, levando à fragmentação celular ⁴³. As caspases humanas envolvidas na apoptose são: caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9 e -10 ⁴⁴. As pró-caspases iniciadoras 2, 8, 9 e 10 são ativadas com a

ajuda de um adaptador de moléculas próximo a essas proteases, permitindo a auto-ativação das mesmas. Com exceção da caspase-2, as caspases iniciadoras clivam as caspases efetoras -3, -6 e -7, que por sua vez, clivam outras proteínas levando à morte celular ⁴⁵.

Existem duas vias envolvidas no processo de apoptose (Figura 3): a via extrínseca, iniciada pela ativação de receptores de morte celular e mediada pela caspase-8 e a via mitocondrial, mediada pela caspase-9. Ambas podem ativar a caspase-3, a via final comum que leva a morte celular programada. A via mitocondrial pode ser ativada por EROs ⁴⁴. Além disso, a caspase-2, expressa na maioria dos tecidos, pode induzir a liberação de proteínas mitocondriais ligadas à apoptose ⁴⁶ e ativar caspase-8 ⁴⁷.

A caspase-9 é considerada uma das caspases-chave em mamíferos, sendo que sua ativação requer a formação de um complexo com o Fator Ativador de Protease (Apaf-1) e citocromo c. Apaf-1 exerce um papel importante na apoptose mediada pela via mitocondrial ⁴⁸. Sabe-se que a PA pode ativar essa via, induzindo a apoptose de hepatócitos ⁴⁹.

In vivo, as vias de morte celular, a saber, por necrose ou apoptose, são menos distintas uma da outra, entretanto, apoptose é mais evidente nas pancreatites de média gravidade, e necrose é mais comum nas pancreatites graves ^{50,51}. Embora os fatores determinantes, a natureza e extensão da mudança de apoptose à necrose na pancreatite continuem desconhecidos, as mitocôndrias parecem desempenhar um papel central neste evento ⁵².

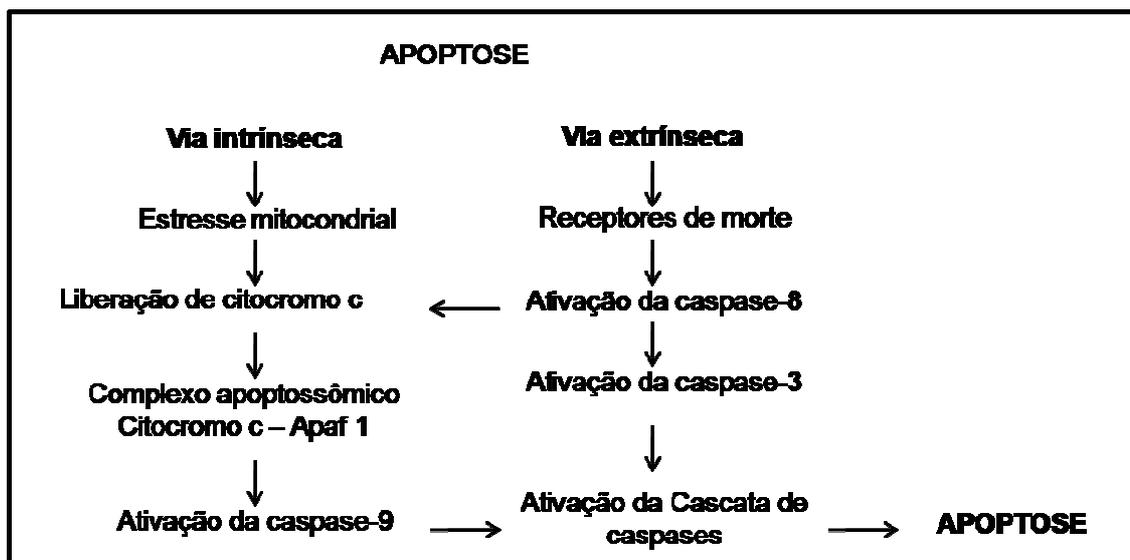


Figura 3: Vias intrínseca e extrínseca da apoptose. Ativação de receptores de morte como TNF ativam a caspase iniciadora 8, que leva à morte celular pela via extrínseca. Na via intrínseca, estresse resultante de alterações na respiração mitocondrial, leva à liberação de citocromo c, que forma um complexo com o fator ativador de protease (Apaf-1), resultando na ativação da caspase-9 que, assim como a caspase-8, pode ativar as caspase efetoras -3,-6 e -7, responsáveis pela clivagem de substratos celulares e pelas mudanças bioquímicas e morfológicas associadas à morte celular⁵³.

1.5. REMODELAMENTO TECIDUAL

Embora o fígado normal seja primariamente composto por células do parênquima, e o tecido fibroso seja quantitativamente limitado, a matriz extracelular (MEC) é importante na fisiologia e patologia hepática. Qualquer modificação na MEC, seja quantitativa, topográfica ou qualitativa, tem efeito direto nas funções hepáticas⁵⁴. No fígado normal a MEC é um compartimento limitado, compreendendo menos de 3% de uma área relativa em uma secção normal de fígado. A MEC forma um arranjo de várias

macromoléculas que servem de arcabouço para o fígado. Além da cápsula de Glisson, a MEC é restrita, no fígado normal, aos tratos portais, paredes sinusoidais e veia central, onde funciona como uma fronteira entre o fluxo sangüíneo e o parênquima ⁵⁵.

As proteínas encontradas com freqüência na MEC hepática são os colágenos, sendo que os colágenos dos tipos I, III, IV e V são os mais abundantes ⁵⁴. Os colágenos tipos I, III e V são os maiores constituintes do colágeno fibrilar que está principalmente confinado ao trato portal e à parede da veia central. A principal função da MEC ainda é a de resistência e coerência mecânica do fígado, mas ela exerce um importante papel em diferentes funções biológicas como proliferação celular, migração, diferenciação e expressão gênica ⁵⁴.

Lesões crônicas e agudas do fígado induzem uma notável expansão de células de tecido conectivo e concomitante deposição anormal de proteínas da MEC, cujo acúmulo é característica comum em muitas doenças hepáticas e alteram a arquitetura do órgão por desenvolverem nódulos de regeneração ⁵⁶. As CEH exercem um papel crucial no acúmulo de colágeno no fígado e são responsáveis por essa deposição de proteínas ⁵⁷.

Diversos estudos experimentais mostraram que apoptose de células hepáticas é o passo inicial no processo de indução de fibrogênese ⁵⁸. Após a lesão hepática aguda, células do parênquima regeneram e substituem as células em necrose ou apoptose. Se a lesão persistir, os hepatócitos são substituídos por MEC, incluindo colágeno fibrilar. O acúmulo de MEC resulta tanto do aumento da síntese quanto do decréscimo da degradação ⁵⁹.

A apoptose de hepatócitos danificados estimula a ação fibrogênica de miofibroblastos do fígado. Células inflamatórias, linfócitos e polimorfonucleares ativam as CEH a secretarem colágeno ⁶⁰. Além disso, essas células ativadas secretam quimiocinas inflamatórias, expressam moléculas de adesão e modulam a ativação de linfócitos ⁵⁹. Células de Kupffer liberam mediadores citotóxicos como EROs que ativam as CEH para síntese de colágeno tipo I e são centrais na resposta fibrogênica do fígado à agressão ⁶¹.

1.6. METALOPROTEINASES - MMPs

A MEC consiste em uma rede complexa e organizada de macromoléculas que está subjacente às células epiteliais ou envolvendo as células do mesênquima ⁶². É composta por vários tipos de macromoléculas, como as glicosaminoglicanas, proteoglicanas; proteínas fibrosas, como o colágeno e a elastina, ambos com função estrutural; glicoproteínas como fibronectina, nidogênio e laminina são também muito importantes, porque apresentam função adesiva ⁶³.

Enzimas proteolíticas, como as MMPs, são necessárias para a degradação da MEC ⁶⁴. Até o momento aproximadamente 26 MMPs foram identificadas nos vertebrados sendo vinte e duas delas observadas nos tecidos humanos ⁶⁵⁻⁶⁸.

As MMPs são uma família de enzimas envolvidas em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos que requerem a degradação da MEC, como embriogênese, reparo de tecidos, remodelamento tecidual, angiogênese e invasão de células inflamatórias. MMPs são endopeptidases dependentes de Ca^{2+} e Zn^{2+} e capazes de degradar colágeno I (intersticial), colágeno IV (lâmina basal), fibronectina, laminina e gelatina. As MMPs são secretadas como pró-enzimas latentes, ativadas por proteólise limitada, e são inibidas por inibidores teciduais de MMPs específicos (TIMPs). A atividade biológica das MMPs é resultado do balanço entre a ativação do zimogênio e a inibição da forma ativa pelos TIMPs ^{64, 69, 70}.

A classificação das MMPs em diferentes subgrupos é feita de acordo com a especificidade do substrato e sua estrutura primária em: collagenases, gelatinases, estromelisina e metaloproteinase tipo estromelisina, metaloproteinase tipo membrana (MT-MMP) e as outras metaloproteinases ^{67, 71-72}.

A estrutura tridimensional das MMPs (Figura 4) contém, em geral: um domínio pró-peptídeo responsável pela latência das pró-enzimas que, através de um resíduo de cisteína, se liga ao zinco no domínio catalítico, cobrindo o sítio ativo; um domínio carboxi-terminal com repetições de hemopexina conectado ao domínio catalítico por uma região do tipo dobradiça (“hinge”); um domínio traducional, peptídeo sinal responsável por endereçar a enzima na secreção ⁷³. As MMP2 -2 e -9 diferem das demais por apresentarem um domínio semelhante à fibronectina entre os domínios catalítico e hemopexina ⁷⁴⁻⁷⁶.

As MMPs são secretadas por várias células humanas (fibroblastos, células epiteliais, leucócitos, macrófagos) como pró-enzimas latentes (zimogênio) que necessitam ser ativadas no ambiente extracelular pela quebra da união do zinco no seu centro ativo, através de processos físicos, químicos ou proteolíticos. Essa clivagem do pró-peptídeo da enzima secretada pode ser ativada pela ação de enzimas proteolíticas de outras famílias como também pelas próprias MMPs ^{70, 77-78}.

As MMPs-2 (gelatinase B) e -9 (gelatinase A) são particularmente importantes na infiltração tecidual pelos polimorfonucleares durante a inflamação uma vez que podem degradar componentes da membrana basal vascular, como colágeno tipo IV, além de fibronectina e gelatina ⁶⁷. A MMP-2 pode também clivar colágeno tipo I, e a MMP-9 digere os colágenos tipo I, II e V ⁷¹.

A potencial atividade destrutiva das metaloproteinases é limitada por IL-10, que não somente inibe a produção de MMP-2 e -9, mas também induz a produção de TIMPs ⁷⁹. Diversas citocinas como o INF- γ , IL-4 e TGF- β diminuem a produção de MMPs. Entretanto IL-1 e TNF- α aumentam a produção e a secreção destas enzimas ⁶⁹.

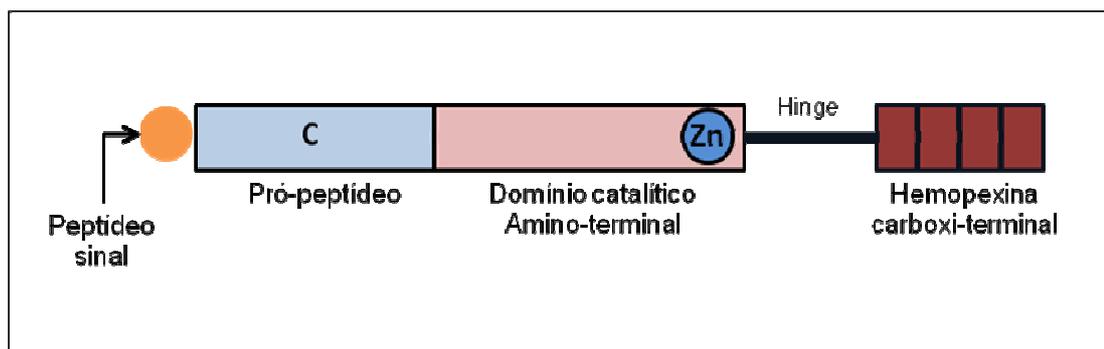


Figura 4: Estrutura geral das Metaloproteinases. “C” denota o resíduo de cisteína no pró-peptídeo que se liga ao zinco (Zn) do domínio catalítico mantendo a enzima inativa. Este domínio conecta-se às repetições de hemopexina através de uma região do tipo dobradiça (“hinge”).

1.7. “HEAT SHOCK PROTEINS” - HSPs

As proteínas ativadas por choque térmico (HSPs, *Heat Shock Proteins*) são um grupo de proteínas presentes em todas as células em condições fisiológicas ou expressas em resposta ao estresse⁸⁰. Funcionam como chaperonas moleculares e atuam sobre o dobramento, transporte intracelular, translocação, degradação e montagem de proteínas⁸¹.

Em sua maioria, as HSPs exercem um efeito protetor contra o dano celular que tem sido relacionado à diminuição das citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α ¹. Sua expressão pode ser induzida por uma variedade de estresses fisiológicos incluindo temperatura, EROs, endotoxinas, íons de metais pesados, aminoácidos, infecções, inflamação e auto-imunidade⁸².

Na PA induzida em ratos, com diferentes agentes como a ceruleína, colecistocinina (CCK), arginina e taurocolato observa-se um aumento na

expressão de HSP70 ^{82, 83-84} e, em contrapartida, uma diminuição nos níveis da HSP60 associados à redução da resposta inflamatória ^{81, 83-84}. Outros autores observaram que ativação do tripsinogênio, evento fundamental para o início da PA, foi reduzida pela indução de HSP60 ⁸⁵.

Os mecanismos pelos quais as HSPs promovem proteção contra os danos associados à PA não são bem entendidos, mas podem estar relacionados à diminuição dos níveis de moléculas pró-inflamatórias, aumento da resistência a necrose e a apoptose ou efeitos antioxidantes ⁸¹. Outro mecanismo pelo qual as HSPs poderiam modular a fisiopatologia da PA, seria pela atuação dessas proteínas na homeostase do cálcio que, por sua vez, regula diversos processos celulares, como a apoptose ⁸⁶.

HSP47 é uma proteína do retículo endoplasmático cuja função é ligar-se especificamente ao pró-colágeno, auxiliando no seu processamento e prevenindo secreção de colágeno mal-formado sob condições de estresse ⁸⁷. A expressão de HSP47 é altamente induzida sob condições patológicas como fibrose hepática, correlacionando-se positivamente com colágenos tipos I e III ⁸⁸. No fígado, HSP47 é expressa especialmente nas CEH, também responsáveis pela produção da MEC ⁸⁹.

1.8. SOLUÇÃO HIPERTÔNICA (NACL 7,5%)

Atualmente, os estudos de PA focam os eventos relacionados à digestão pancreática, SIRS, translocação bacteriana e distúrbios

microcirculatórios ⁹⁰⁻⁹². Sabe-se que PA causa alterações na perfusão hepática mediadas tanto pela inflamação local quanto pela sistêmica ^{93,94}.

Correção do desequilíbrio hemodinâmico, suporte nutricional adequado, controle da dor e monitoramento das complicações são os alvos no tratamento de PA ⁹⁵. Estudos experimentais demonstraram que NO, bloqueadores de receptores endoteliais, antagonistas de receptores de Fator Ativador de Plaquetas (PAF) e anticorpos contra molécula de adesão intercelular (ICAM) são eficientes na melhora dos distúrbios microcirculatórios durante a PA ⁹⁶⁻¹⁰⁰.

Desde 1980, quando Velasco e colaboradores ¹⁰¹ observaram os efeitos benéficos do uso de solução salina hipertônica (SH) na ressuscitação de cães com choque hemorrágico, muitos autores têm investigado essa solução. Os autores observaram que o tratamento com SH promovia a restauração imediata da pressão arterial e débito cardíaco, além de causar elevação da osmolaridade plasmática, correção da acidose, expansão da volemia e aumento da sobrevida.

A SH recupera volume plasmático e pressão arterial devido à mobilização de fluidos do espaço intracelular para compartimentos extracelulares por causa do gradiente osmótico produzido ¹⁰²; melhora do débito cardíaco por aumento da sobrecarga e redução do edema endotelial e tissular ¹⁰¹; promove vasodilatação arteriolar ¹⁰³ e melhora da microcirculação ^{104,105}, restaurando o fluxo sanguíneo e as funções renal, hepática e mesentérica ¹⁰⁶.

Na ressuscitação com SH, o fluido intracelular é primariamente removido de células endoteliais e eritrócitos. Este efeito é mais pronunciado em capilares onde o edema é maior. Isto produz uma redução na resistência hidráulica e uma melhora na perfusão tecidual ¹⁰⁴.

Diversos estudos têm mostrado que a hipertonicidade pode atuar também no sistema imunológico pela ativação da expressão gênica ¹⁰⁷, regulação da expressão protéica ^{108,109}, ativação de quinases envolvidas na sinalização da cascata intracelular ^{110,111} e promoção da adesão celular ¹¹², assim como regulação da produção de EROS e citocinas ¹¹⁰. Devido a estes efeitos, há um grande interesse no uso de SH como agente anti-inflamatório para o tratamento de choque séptico, trauma, choque hemorrágico e disfunção de órgãos ^{113,114}.

Na PA experimental, SH limitou lesão local e de órgãos distantes através da alteração do volume de plasma circulante, redução da ativação do tripsinogênio, prevenção da necrose acinar, redução dos níveis de citocinas e prevenção da infecção pancreática, reduzindo a mortalidade ¹¹⁵⁻¹¹⁹.

A SH também pode influenciar a transcrição, função e expressão de MMPs, enzimas que exercem um papel crucial no reparo tecidual, morte celular e morfogênese ⁸⁴. As HSPs, por sua vez, foram moduladas pela SH em modelo de choque hemorrágico ¹²⁰ e PA ⁸⁴.

Oreapoulos e colaboradores ¹²¹ mostraram que a SH reduz a expressão de ICAM-1 em território hepático submetido à isquemia, suprimindo a infiltração neutrofílica. Pascual e colaboradores ¹²² sugerem

que a solução hipertônica altera as interações entre neutrófilos e as células endoteliais, diminuindo a permeabilidade vascular aos polimorfonucleares.

Os efeitos imunomodulatórios da SH devem-se a alta tonicidade ocasionada pelo aumento da concentração de sódio ^{123,124}. Evidências recentes sugerem que a reorganização do citoesqueleto é crítico para a transdução de sinal mediada por receptor ¹²⁵. A alteração da forma da célula pela SH é capaz de reorganizar o citoesqueleto tendo como resultante um efeito imunomodulatório ¹¹¹.

Há dados indicando que a SH aumenta a transcrição gênica da IL-10 e reduz os níveis de TNF- α em macrófagos peritoneais de camundongos, independente de NF- κ B ¹²⁶. O uso de SH reduziu a expressão de TNF- α e IL-6 nos cardiomiócitos, melhorando a função cardíaca no choque ¹²⁷. Recentemente, Horton e colaboradores ¹²⁸ confirmaram estes dados descrevendo que SH combinada com 6% de dextran atenua a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em diversas populações celulares. Estas ações podem explicar o menor grau de lesão com a administração de SH, que reduz sem, contudo, abolir as vias pró-inflamatórias, permitindo um adequado balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias, mantendo a habilidade para eliminar as bactérias eficientemente e reduzindo a inflamação disseminada ¹¹⁴.

Os efeitos da SH na microcirculação, bem como na expressão e atividade de diversas proteínas e no equilíbrio das citocinas e EROS apontam para a possibilidade de uma ação terapêutica na lesão hepática durante a PA.

Objetivos

2. OBJETIVO GERAL

Analisar se o tratamento com solução hipertônica reduz a resposta inflamatória no fígado, modulando o estresse oxidativo e os processos de morte celular e remodelamento tecidual hepático durante a pancreatite aguda.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a relação entre níveis de citocinas teciduais no fígado e no plasma (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10) e a lesão hepática durante a PA, analisando o envolvimento destes fatores no grau de apoptose e no estresse oxidativo, bem como os efeitos do tratamento com SH.

Justificativa: A produção de iNOS é dependente do balanço de citocinas, muitas das quais já foram identificadas como indutoras de apoptose hepatocelular durante a PA. A SH regula a liberação de citocinas.

- Verificar se a SH modula expressão das HSPs 47, 60, 70 e 90 e se há redução no processo inflamatório.

Justificativa: As HSPs modulam a liberação de citocinas e podem reduzir o processo inflamatório. A HSP47 está relacionada ao remodelamento

tecidual. Ativação de HSPs pode ser o mecanismo pela qual a SH altera a produção e liberação de citocinas.

- Estudar a relação entre estresse oxidativo/nitrativo, apoptose e remodelamento tecidual, analisando a produção de NO, EROs, expressão de MMPs e colágeno e o efeito da SH nesses processos.

Justificativa: Há uma íntima relação entre iNOS, apoptose e fibrogênese hepática. A iNOS pode, sob diferentes condições de estresse oxidativo, potencializar ou inibir a apoptose no tecido hepático que, por sua vez, é um importante indicador da fibrogênese pela ação de miofibroblastos no fígado. EROs modulam a expressão de MMPs, particularmente importantes na infiltração de células inflamatórias e na degradação de colágeno.

Metodologia

3. METODOLOGIA

3.1. INDUÇÃO DE PANCREATITE

Ratos machos Wistar entre 270 e 330 gramas de peso foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Parke-Daves) na dose de 10 mg/Kg de peso e xilasina (Bayer) na dose de 8 mg/Kg de peso. Através de uma incisão abdominal, o pâncreas foi exteriorizado e o ducto pancreático cateterizado através da parede duodenal utilizando-se um tubo de polietileno PE-50 (Biotecno). A PA foi induzida pela injeção retrógrada de 0,1 ml/100g de solução de taurocolato de sódio (Sigma Chemical) a 2,5%.

Para a reposição volêmica e estudo dos tratamentos (solução fisiológica e hipertônica), a veia jugular interna foi canulada com um cateter de polietileno (PE50; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) vinte e quatro horas antes da indução de PA. Os animais foram sacrificados quatro, doze e vinte-e-quatro horas após a indução da PA e as amostras de interesse (tecido hepático e plasma) foram coletadas e submetidas à análise.

Os animais foram randomizados em 4 grupos:

- 1) controle (c): animais que não sofreram cirurgia, nem tratamento;

- 2) pancreatite sem tratamento (past): animais que sofreram indução de PA e não receberam reposição volêmica;
- 3) pancreatite e tratamento com solução fisiológica (pas): animais que sofreram indução de PA e após 1 hora receberam tratamento endovenoso com solução fisiológica de NaCl 0,9% (34 ml/Kg de peso);
- 4) pancreatite e tratamento com solução hipertônica (pah): animais que sofreram indução de PA e após 1 hora receberam tratamento endovenoso com solução hipertônica de NaCl 7,5% (4 ml/Kg de peso).

3.2. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA – RT-PCR

O RNA total foi extraído com 1 ml de Trizol (Invitrogen) para cada 100mg de tecido pulverizado em nitrogênio líquido. O material foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 200 µl de clorofórmio (Merck), os tubos foram agitados e incubados por 3 minutos à temperatura ambiente. Seguiu-se a centrifugação do material a 4°C por 15 minutos a 12000g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo onde foram adicionados 500 µl de isopropanol gelado. Após 10 minutos de incubação, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 12000g. O sobrenadante foi desprezado e, o *pellet* foi reconstituído em 50 µl de água com 0,1% de Dietilpirocarbonato (Sigma). A partir de 1 µg de RNA total, o cDNA foi sintetizado com 1µl de transcriptase reversa Impron II (Promega); 1µl de Oligo dT (0.5µg/ul - Promega); 1µl de dNTP (10mM – Invitrogen); 6µl

de buffer 5 X (Promega); 0.5µl de RNAsin (Promega), 2.4µl de Cloreto de magnésio (25mM). A reação foi incubada em termociclador MJ Research PTC-200 por 50 minutos a 42°C e por 15 minutos a 70 °C. Após a síntese de cDNA fez-se uma reação de Reação de Polimerase em Cadeia – Transcriptase Reversa (RT-PCR) para amplificação de rRNA (RNA ribossomal) como controle positivo e teste da viabilidade de cada amostra.

O RNAm foi amplificado pela transcrição reversa em reação de RT-PCR a partir de 25µl do volume total com 17.75µl de água deionizada estéril; 2.5µl de tampão 10X (Invitrogen); 1µl de cloreto de magnésio a 50mM (Invitrogen); 0.5µl de dNTPs 10mM; 1µl de cada primer a 10 pmol/µl (Invitrogen); 0.25µl de Taq polimerase (Invitrogen) e 1µl de cDNA em termociclador PTC 200 MJ Research. Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo para eliminar uma possível contaminação da reação. Para a avaliação da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de 1% de agarose corado com brometo de etídeo (Horizon® – Life Technologies). Todas as amostras foram normalizadas pelo rRNA.

Foram utilizados os seguintes primers:

1. rRNA (Invitrogen) sense: GAAAGATGGTGA ACTATGCC; rRNA antisense:TTACCAA AAGTGGCCCACTA; 30 ciclos; 95°C por 1 minuto; 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e extensão de 70°C por 10 minutos, gerando um produto de 320pb.

2. HSP60 (Invitrogen) sense: TGACACCCTTTCTTCCAACC;
antisense:AGCAAAGGGGCTAATCCAGT; 30 ciclos; 95°C por 1
minuto; 56,9 °C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto e extensão 70°C por
10 minutos, gerando um produto de 213pb.
3. HSP70 (Invitrogen) sense: ACAAGTGCCAGGAGGTCATC;
antisense: CTAGCCAACACCCTGAGAGC; 28 ciclos; 95°C por 1
minuto; 56,9 °C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto e extensão 70°C por
10 minutos, gerando um produto de 243pb.
4. HSP90 (Invitrogen) sense: GATTGACATCATCCCCAACC;
antisense: CTAGCCAACACCCTGAGAGC; 28 ciclos; 95°C por 1
minuto; 59,3 °C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto e extensão 70°C por
10 minutos, gerando um produto de 247pb.
5. iNOS (LGC biothecnology) sense: CACCTTGGAGTTCACCCAGT;
antisense: ACCACTCGTACTTGGGATGC; 35 ciclos; 94°C por 0,5
minuto; 92 °C por 1 minuto; 63,5°C por 1 minuto e extensão 72°C por
10 minutos, gerando um produto de 170pb.

3.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA - WESTERN BLOT

Fragmentos de 100mg de tecido foram pulverizados em nitrogênio líquido. O material foi homogeneizado em tampão de lise TX-100 (100mM de

Tris-HCl pH 7.5, 1% de desoxicolato de sódio, 1% de Triton X-100, 150mM de NaCl, 0.1% SDS) acrescido de inibidores de proteases (1mg/ml pepstatina A, 100mM PMSF). Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 14000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, e a concentração de proteínas foi quantificada pelo método de Bradford (Bio-Rad). As amostras de proteínas foram acrescidas de tampão de amostra (2% SDS, 60mM Tris pH 6.8, 5% de mercaptoetanol e 0.01% de azul de bromofenol) e submetidas à eletroforese em um sistema SDS-PAGE, gel 10% de poliacrilamida (1.5M Tris-HCl, 10% SDS, 30% bis-acrilamida, 10% de persulfato de amônia e TEMED). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) em aparelho de transferência semi-seca (*Semi-dry Transfer* -Bio-Rad). As membranas foram incubadas em solução de bloqueio 5% de leite desnatado em tampão TBST (50mM de tampão Tris, pH 8.0, 100mM NaCl, 1% Tween 20) por 1 hora à temperatura ambiente e em seguida, foram lavadas em TBST durante 30 minutos e incubadas com o anticorpo primário contra as proteínas de interesse: MMP-2 (*rabbit* policlonal, diluição 1:1000, sc10736, Santa Cruz Biotechnology - sc, Santa Cruz, CA, USA); MMP-9 (*rabbit* policlonal, diluição 1:1000, sc6840); colágeno tipo I (*goat* policlonal, diluição 1:1000, sc8784); colágeno tipo III (*rabbit* policlonal, diluição 1:1000, sc8780-R); caspase-2 (*rabbit* policlonal, diluição 1:1000, sc623); caspase-7 (*rabbit* policlonal, diluição 1:1000, sc-337773); Apaf-1 (*goat* policlonal, diluição 1:1000, sc-26685); AIF (*rabbit* monoclonal, diluição 1:1000, ab32516, Abcam); iNOS (*rabbit* policlonal, diluição 1:1000, sc651); HSP47 (*rabbit* policlonal, 1:1000,

sc8352); HSP60 (*goat* policlonal, diluição 1:1000, sc1052); HSP70 (*goat* policlonal, diluição 1:1000, sc1060); HSP90 α/β (*goat* policlonal, diluição 1:1000, sc1055); β -actina (mouse, diluição 1:10000, A5441; Sigma). Todos os anticorpos foram incubados “*overnight*” a 4°C. Posteriormente, as membranas foram lavadas novamente com TBST e incubadas em solução contendo anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP *goat* anti-*rabbit* policlonal-sc2004 ou HRP *rabbit* anti-*goat* sc2768, diluição 1:5000) à temperatura ambiente por 1 hora. Finalmente, as membranas foram lavadas com TBST e expostas ao sistema de detecção utilizando o reagente quimioluminescente Super Signal (Pierce Rockford, IL, USA) e filme fotográfico (Kodak, Rochester, NY, USA). Nas amostras dos grupos controle, past, pas e pah, a expressão da proteína foi comparada por densitometria de gel, utilizando-se o programa de domínio público “Image J” (Wayne Rasband, National Institutes of Mental Health, NIH, USA), normalizadas pelo controle (controle=1).

3.4. ANÁLISE DA ATIVIDADE DAS METALOPROTEINASES (MMP) -2 E -9 – ZIMOGRAFIA

A zimografia é uma técnica usada para analisar a atividade funcional das MMPs em amostras biológicas. Essa técnica envolve a separação de proteínas por eletroforese, sob condição de desnaturação (pelo SDS), mas não de redução (sem mercaptoetanol), através de um gel de poliacrilamida

contendo gelatina (substrato para as MMPs -2 e -9). Amostras dos tecidos coletados foram homogeneizadas em tampão de lise TX-100 (1% Triton X-100, 10% glicerol, 135mM NaCl, 20mM Tris pH 8.0). Em seguida, as amostras de lisado foram centrifugadas a 14000g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado, e a concentração de proteínas quantificada pelo método de Bradford. Amostras de 5 µg/ml de proteínas foram acrescidas de tampão de amostra (2% de SDS, 60mM Tris pH 6.8, 30% de glicerol e 0.01% de azul de bromofenol) e aplicadas em gel 10% de poliacrilamida contendo 0.2% de gelatina. Após a eletroforese, o gel foi lavado em 10mM de Tris (pH 8.0) contendo 2.5% de Triton X-100, para remoção do SDS e renaturação das proteínas. Em seguida, o gel foi incubado por 15 minutos em solução tampão reveladora (50mM de Tris pH 8.8, 5mM CaCl₂, 0.02% NaN₃). Posteriormente, o gel foi incubado por 72 horas à 37°C apenas na solução reveladora. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Amersham) por 2-3 horas. Em seguida, foi descorado em solução de 40% de metanol e 10% de ácido acético glacial em água destilada. As MMPs são identificadas como bandas claras de lise em fundo azul. A expressão das proteínas foi analisada por densitometria de gel, utilizando-se o programa de domínio público "Image J". As amostras dos grupos past, pas e pah foram normalizadas pelo controle (controle=1).

3.5. MARCAÇÃO DE NITROTIROSINA – IMUNO-HISTOQUÍMICA

A fim de analisar a formação de peroxinitrito, a nitração da tirosina foi detectada no fígado através da técnica de imuno-histoquímica. Tecidos fixados em formalina foram embebidos em parafina para a secção em fragmentos de 4µm e montagem em lâmina histológica. Os fragmentos foram desparafinizados, reidratados e digeridos com citrato de sódio. A absorção não específica foi minimizada pela incubação dos fragmentos em H₂O₂ 0.3% durante 50 minutos, seguida pelo bloqueio com avidina-biotina durante 10 minutos e com caseína 5% por 5 minutos. As lâminas foram incubadas com anticorpo anti-nitrotirosina (Molecular Probe, A21285, diluição 1:1000), “overnight” à 4°C e anticorpo secundário anti-*rabbit* IgG (VECTASTAIN® ABC kits, PK6101). A seguir, as lâminas foram submetidas à reação positiva com o kit DAB (Sigma D5637) e contra-coradas com hematoxilina. As imagens foram adquiridas utilizando o sistema de imagem Leica (Q500 iW, Cambridge, UK). A coloração correspondente à marcação marrom da nitrotirosina foi quantificada em 10 áreas iguais em tamanho de cada lâmina histológica, obtendo-se uma média dos valores para cada animal dos 10 grupos experimentais.

3.6. ANÁLISE DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA – TBARS

A quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) foi utilizada para determinar a taxa de peroxidação lipídica. Amostras de 100mg de tecido hepático foram homogeneizadas com triturador de tecidos em 1mL de KCl 1.15% e centrifugadas à 10000rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante (homogenato de fígado) foi coletado e acondicionado em tubos a -80°C até o momento da dosagem. A dosagem foi feita utilizando-se 100µl de homogenato de tecido hepático, acrescidas de 100µl de SDS a 8.1%, 750µl de ácido acético a 20% e 750µl de ácido tiobarbitúrico a 0.8%. A mistura foi aquecida a 95°C por 40 minutos. A solução foi centrifugada para medida a absorbância do sobrenadante utilizando comprimento de onda de 532nm no leitor de placa Tecan Genius (Salzburg, Austria).

3.7. DOSAGEM NITRITO/NITRATO - REAÇÃO DE GRIESS

Amostras de fígado foram processadas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão de lise TX-100 acrescido de inibidores de proteases. As amostras foram centrifugadas a 14000rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas quantificada pelo método de Bradford. As amostras de sangue heparinizadas foram centrifugadas a 1000rpm durante cinco minutos. O plasma foi coletado e

congelado a -80°C até o momento da dosagem. O método de detecção foi baseado na reação do nitrito com reagente de Griess produzindo uma reação colorimétrica detectada por absorvância com leitura em comprimento de onda de 595nm. O nitrato presente na amostra foi reduzido à nitrito utilizando-se as enzimas nitrato redutase e NADPH. A concentração de nitrito foi dividida pela quantidade de proteína presente nas amostras. Para a reação de nitrato, reage-se 50 μl da amostra ou padrão (ou de diluente, para o branco), com 25 μl da solução de nitrato redutase (10 unidades dissolvida em 16.4mL de Tris 40 mM, pH 7.4) e 25 μl da solução de NADPH (6.7mg em 50mL de Tris). Incubou-se por 2h a temperatura ambiente. Para a reação de Griess foram adicionados 100 μl da solução de trabalho (solução A: 1% de sulfanilamida em ácido fosfórico a 5%; solução B: 0,1% de naftil-etilenodiamina em água destilada; misturar partes iguais das soluções A e B). Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente a foi feita a leitura em comprimento de onda de 595nm no leitor de placa Tecan Genius (Salzburg, Austria). O mesmo protocolo, sem adição de nitrato redutase, foi utilizado para a dosagem de nitrito, fazendo-se a leitura a 595 nm.

3.8. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS - ELISA

As citocinas TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-1 β foram dosadas a partir de homogenato de tecido hepático. Aproximadamente 100mg de tecido foram homogeneizados em 1ml de solução TX-100 (1% Triton X-100, 10% glicerol,

135mM NaCl, 20mM Tris pH 8,0). O material foi centrifugado à 14000g por 20 minutos para coleta do sobrenadante. As medidas foram normalizadas pela concentração de proteínas na solução (Método de Bradford–Biorad). As amostras de sangue heparinizadas foram centrifugadas a 1000rpm durante cinco minutos. O plasma foi coletado e congelado a -80°C até o momento da dosagem. As dosagens foram feitas por ELISA, com kit da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

Placas de 96 poços foram adsorvidas com anticorpo de captura monoclonal anti-citocina de interesse, diluído em PBS por 12 horas. Em seguida, as placas foram lavadas com solução de PBS contendo 0.05% de Tween 20. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS contendo 1% de BSA (soro albumina bovina – Sigma) por 1 hora. A placa foi lavada para remoção da solução de bloqueio. Em seguida, as amostras e os padrões foram colocados nos respectivos poços e incubados por 2 horas. Ao final do período, as placas foram lavadas. Adicionou-se o anticorpo de detecção, conjugado a peroxidase, e incubou-se por 2 horas. As placas foram, novamente, lavadas. Ao final das lavagens, adicionou-se o substrato da peroxidase, tetrametilbenzidina, deixando reagir por 15 a 20 minutos. A reação peroxidase-tetrametilbenzidina gerou cor azul. Ao final da incubação, adicionou-se solução de parada ($\text{H}_2\text{SO}_4 - 2\text{N}$), obtendo-se coloração amarela. As citocinas foram quantificadas pela leitura da absorbância (450nm) em leitor de placa Tecan Genius (Salzburg, Austria) e os resultados foram expressos em picogramas de antígeno por miligrama de proteína.

3.9. ANÁLISE DA ATIVIDADE DE ALT (ALANINOAMINOTRANSFERASE)

As enzimas aminotransferases, quando elevadas, sugerem disfunção hepática, relacionada às lesões de destruição do tecido ou alteração da permeabilidade celular. Para investigar essa lesão em nosso modelo experimental, amostras de sangue foram coletadas dos animais de todos os grupos para medir Alaninoaminotransferase (ALT) usando um analisador automático (ADVIA® 1200, WB Saunders Company, Philadelphia PA).

3.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram analisados com testes estatísticos paramétricos do tipo análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey-Kramer entre os grupos por horário (4, 12 e 24 horas) utilizando-se o programa Sigma Stat V3.1 (Sigma Stat Software Inc., Chicago, USA). Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Foram considerados como significativas diferenças com $p < 0,05$. Regressão linear foi usada para verificar correlações entre eventos.

Resultados

4. RESULTADOS

Os resultados foram divididos em três categorias, a saber, estresse oxidativo, apoptose e remodelamento tecidual, a fim de facilitar o entendimento da complexidade do processo inflamatório sistêmico e hepático decorrente da PA. Os resultados relacionados ao estresse oxidativo compreendem as análises da produção de citocinas teciduais e hepáticas, peroxidação lipídica, produção de alaninoaminotransferase (ALT), expressão gênica e protéica de Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS), produção de nitrito/nitrato (NO_2/NO_3), formação de nitrotirosina e expressão das *Heat Shock Proteins* (HSPs) 60, 70 e 90. Dentre os resultados que abrangem os eventos relacionados ao processo apoptótico encontram-se expressão protéica das caspases -2 e -7, do Fator Ativador de Protease (Apaf-1) e do Fator Indutor de Apoptose (AIF). As análises de expressão/atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs), expressão protéica dos colágenos tipos I e III e da HSP47 foram reunidas na categoria “remodelamento tecidual”.

4.1. ESTRESSE OXIDATIVO

4.1.1. CITOCINAS HEPÁTICAS

As citocinas IL-1 β , IL-10, IL-6 e TNF- α foram dosadas no homogenato de fígado (Figura 5). Os dados representam a média de 4 a 9 animais por grupo experimental.

Os animais do grupo controle exibem concentração basal de IL-1 β (A) que aumenta significativamente em 4 horas no grupo pas ($p < 0.05$ *versus* c, past). Após 12 e 24 horas, não há diferenças entre os grupos.

A produção de IL-10 (B) não se modifica nas primeiras 4 horas após indução de PA. Entretanto, a concentração desta citocina aumenta no grupo past, 12 horas após a indução da PA quando comparado aos grupos controle, pas e pah ($p < 0.05$). Em 24 horas o grupo pas apresenta um aumento de IL-10 ($p < 0.05$ vs. c).

Não há alterações significativas na produção de IL-6 (C) e TNF- α (D) conforme o grupo ou tempo.

4.1.2. CITOCINAS PLASMÁTICAS

As citocinas IL-1 β , IL-10, IL-6 e TNF- α foram dosadas no plasma (Figura 6). Os dados representam a média de 6 a 10 animais por grupo experimental.

A produção de IL-1 β (A) aumenta 4 horas após a indução da PA nos grupos past e pah quando comparados ao controle (respectivamente, $p < 0.05$ e $p < 0.01$). Em 12 horas a concentração desta citocina aumenta significativamente no grupo past ($p < 0.001$ vs. c; $p < 0.01$ vs. pas; $p < 0.001$ vs. pah). Não há diferença entre os grupos pas e pah. Em 24 horas, não há diferenças significativas entre os grupos.

A concentração plasmática de IL-10 apresenta-se aumentada no grupo past nas primeiras horas após a indução da PA ($p < 0.05$ vs. c, $p < 0.01$ vs. pas e pah) e após 24 horas ($p < 0.05$ vs. c). No grupo tratado com solução fisiológica há um aumento nos níveis desta citocina após 12 horas ($p < 0.05$ vs. c).

Em 4 horas há um aumento de IL-6 (C) no grupo past ($p < 0.05$ vs. c). Em 12 e 24 horas não há diferenças entre os grupos estudados.

O controle apresenta níveis basais de TNF- α (D) que aumentam no grupo pah em 4 horas ($p < 0.05$ vs. pah). Nos outros horários não há diferenças entre os grupos.

4.1.3. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica (Figura 7), observada indiretamente pelos níveis hepáticos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), aumenta após a indução de PA nos grupos past e pas ($p < 0.05$ vs. c). Entretanto, o grupo que recebeu SH mantém os níveis basais de peroxidação lipídica em 4, 12 ($p < 0.05$ vs. past) e 24 horas ($p < 0.05$ vs. pas; $p < 0.001$ vs. past). Os dados representam média de 5 a 10 animais por grupo experimental.

4.1.4. ALANINOAMINOTRANSFERASE (ALT)

A fim de verificar os efeitos da SH na lesão de hepatócitos, analisamos os níveis de ALT no plasma. Os níveis plasmáticos basais de ALT (Figura 8) sofrem alteração após 4 horas de indução da PA no grupo que não recebeu tratamento ($p < 0.05$ vs. c). Em 12 horas há um aumento significativo de ALT no grupo pas ($p < 0.01$ vs. c, $p < 0.05$ vs. pah). Em 24 horas não há diferenças entre os grupos. No grupo pah os níveis de ALT permanecem semelhantes ao controle em todos os períodos estudados. Os dados representam a média de 4 a 7 animais por grupo experimental.

4.1.5. EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DE iNOS

A expressão gênica de iNOS (Figura 9A) foi observada somente nas primeiras horas após indução de PA. A transcrição de iNOS aumenta significativamente no grupo submetido à PA que não recebeu nenhum tipo de reposição volêmica ($p < 0.01$ vs. c, pah). Os dados representam um n igual a 5 para expressão gênica e protéica.

A expressão protéica de iNOS (Figura 9B) não se modificou no período estudado. Somente em 12 horas, o grupo past apresentou uma redução dos níveis protéicos de iNOS comparado ao controle ($p < 0.05$).

4.1.6. DOSAGEM DE NITRITO E NITRATO

A figura 10A mostra um gráfico da dosagem dos subprodutos do NO, a saber, nitrito (NO_2) e nitrato (NO_3), através da reação de Griess, no plasma. Não há alteração nos níveis plasmáticos de NO_2/NO_3 entre os grupos no período estudado. Os dados representam a média de 4 a 6 animais por grupo experimental.

A produção de nitrito e nitrato (Figura 10B) não se modifica nas primeiras 4 horas após a indução da PA. Em 12 horas há um aumento significativo de NO_2/NO_3 no grupo pas ($p < 0.05$ vs. c, $p < 0.05$ vs. past, $p < 0.05$ vs. pah). Em 24 horas ocorre um aumento dos subprodutos do NO

(NO₂/NO₃) nos animais que receberam SH ($p < 0.05$ vs. c). Os dados representam a média de 5 animais por grupo experimental.

4.1.7. NITROTIROSINA

A nitração dos resíduos de tirosina foi mais evidente ao redor da veia centrolobular hepática. Indução de PA resultou em uma intensa produção de peroxinitrito e conseqüente expressão de nitrotirosina (Figura 11A). Entretanto a SH reduziu a formação de nitrotirosina ($p < 0.05$ vs. pas 24h) (Figura 11B). Os dados representam uma média de 5 a 10 animais por grupo experimental.

4.1.8. EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DE HSP60

A Figura 12 mostra os géis representativos da expressão gênica (A1) e protéica (B1) de HSP60. A desintometria (A2) das bandas do RT-PCR mostra que não houve alteração nos níveis transcricionais de HSP60. Há um aumento na expressão protéica (B2) de HSP60 em 4 horas em todos os grupos ($p < 0.001$ vs. c). Neste horário o grupo que recebeu SH mostra uma menor expressão de HSP60 comparado ao grupo pas ($p < 0.05$). Em 12 e 24 horas não há alteração da expressão protéica. Os dados representam a

média de 3 a 4 animais por grupo na expressão protéica e de 4 a 7 animais para a expressão gênica.

4.1.9. EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DE HSP70

A figura 13 mostra os géis representativos da expressão gênica (A) e protéica (B) de HSP70. Não foi possível observar alterações significativas dos níveis transcricionais de HSP70. Entretanto, a expressão protéica de HSP70 aumenta significativamente no grupo pas após 12 horas da indução de PA ($p < 0.05$ vs. c). O tratamento com SH mantém os níveis de expressão protéica de HSP70 semelhantes ao grupo controle. Os dados representam a média dos valores de 4 animais por grupo para expressão protéica e de 5 animais para a expressão gênica.

4.1.10. EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DE HSP90

Não foram observadas diferenças significativas na expressão gênica (Figura 14A) ou protéica (Figura 14B) de HSP90 em nenhum dos períodos ou grupos estudados.

4.2. APOPTOSE

4.2.1. EXPRESSÃO PROTÉICA DE CASPASE-2

A Figura 15 mostra os géis representativos da expressão protéica de Caspase-2. Pôde-se observar a expressão do precursor de caspase-2 (51kDa) e da fração Caspase-2L (51kDa). A desintometria das bandas correspondentes à caspase-2L mostra que a expressão basal dessa caspase não se altera nas primeiras horas após a indução de PA.

Após 12 horas da indução de PA, os grupos tratados com solução fisiológica ou hipertônica mostram uma expressão de caspase-2 menor que o controle ($p < 0.05$). Em 24 horas todos os grupos submetidos à PA têm uma redução na expressão dessa proteína ($p < 0.01$). Os dados representam a média de 4 animais por grupo.

4.2.2. EXPRESSÃO PROTÉICA DE APAF-1 E AIF

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis protéicos de Apaf-1 (Figura 16A) e AIF (16B) após a indução de PA durante o período

estudado. Os dados representam a média de 4 animais por grupo experimental para cada uma das proteínas.

4.2.3. EXPRESSÃO PROTÉICA DE CASPASE-7

A figura 17A mostra um imunoblote representativo da expressão de Caspase-7 dos grupos experimentais. O controle exhibe níveis basais de expressão protéica. Através da densitometria (17B) das bandas observamos um aumento da expressão protéica de Caspase-7 no grupo past em 4 horas ($p < 0.01$ vs. c). Após 12 e 24 da indução de PA não houve diferenças estatísticas entre os grupos. Os dados representam a média de 5-9 animais por grupo.

4.3. REMODELAMENTO TECIDUAL

4.3.1. EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE MMP-2

Sabe-se que as MMP-2 e -9 são produzidas normalmente no tecido hepático e podem ser detectadas tanto como pró-enzimas como na sua forma ativa. A expressão protéica de MMP-2 (Figura 18A) aumenta no grupo

pas em 12 horas ($P < 0,01$ vs. c). Neste período, a atividade desta enzima (B) apresenta uma redução nos grupos submetidos à PA comparados ao grupo controle ($p < 0.01$), entretanto a SH normalizou a atividade da enzima em 24 horas.

4.3.2. EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE MMP-9

A desintometria das bandas de expressão protéica de MMP-9 (Figura 19A) mostra um aumento significativo dessa proteína no grupo pas após 4 ($p < 0.01$) e 12 horas da indução de PA ($p < 0.05$). O mesmo foi encontrado para atividade de MMP-9 (19B) nos grupos past e pas ($p < 0.05$ vs. c). Este aumento foi bloqueado pela SH em 4, 12 ($p < 0.05$ vs. past, pas) e 24 horas..

4.3.3. EXPRESSÃO DE COLÁGENO TIPO I E TIPO III

A figura 20 mostra imunoblotes representativos de colágeno tipo I (A1) e colágeno tipo III (B1). A análise densitométrica (A e B) das bandas mostrou uma diminuição na expressão de colágeno III após 4 horas de PA nos grupos past e pas ($p < 0.05$ vs. c). Após 24 horas, houve um aumento do colágeno I no grupo pas ($p < 0.05$ vs. c). Não há diferenças entre os grupos controle e tratado com SH com relação à expressão de colágeno tipo I ou III.

4.3.4. EXPRESSÃO PROTÉICA DE HSP47

A fim de complementar o estudo do processo de remodelamento tecidual hepático, investigamos a expressão de HSP47, uma proteína intrinsecamente associada ao metabolismo do colágeno. O grupo controle apresentou expressão constitutiva de HSP47 (Figura 21A). Após 4 horas da indução de PA, a expressão de HSP47 aumenta nos grupo past e pas ($p < 0.001$ vs. c), permanecendo próxima aos níveis basais no grupo tratado com SH ($p < 0.05$ vs. past e pas). Em 24 horas, o grupo past continua apresentando níveis elevados de expressão protéica de HSP47 ($p < 0.05$ vs. pas, $p < 0.01$ vs. pah). A Figura 21B mostra uma correlação matemática positiva entre a expressão de HSP47 e de MMP-9 ($R = 0.825$; $p < 0.001$, $n = 30$).

Figuras

5. FIGURAS

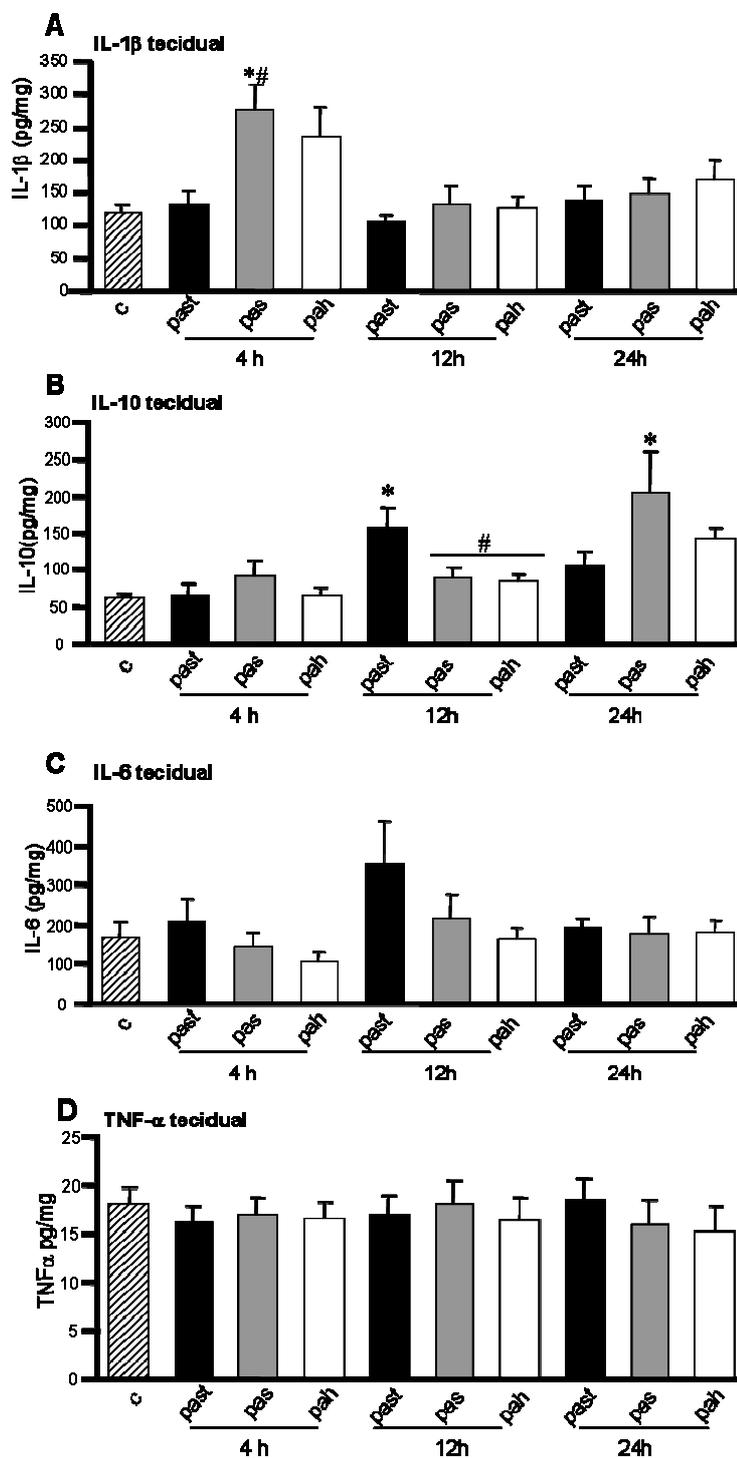


Figura 5: Citocinas Hepáticas

Em (A) Dosagem de IL-1 β no homogenato de fígado, em (B) dosagem de IL-10, em (C) dosagem de IL-6 e em (D) dosagem de TNF- α .

* $p < 0,05$ vs. c; # $p < 0,05$ vs. past.

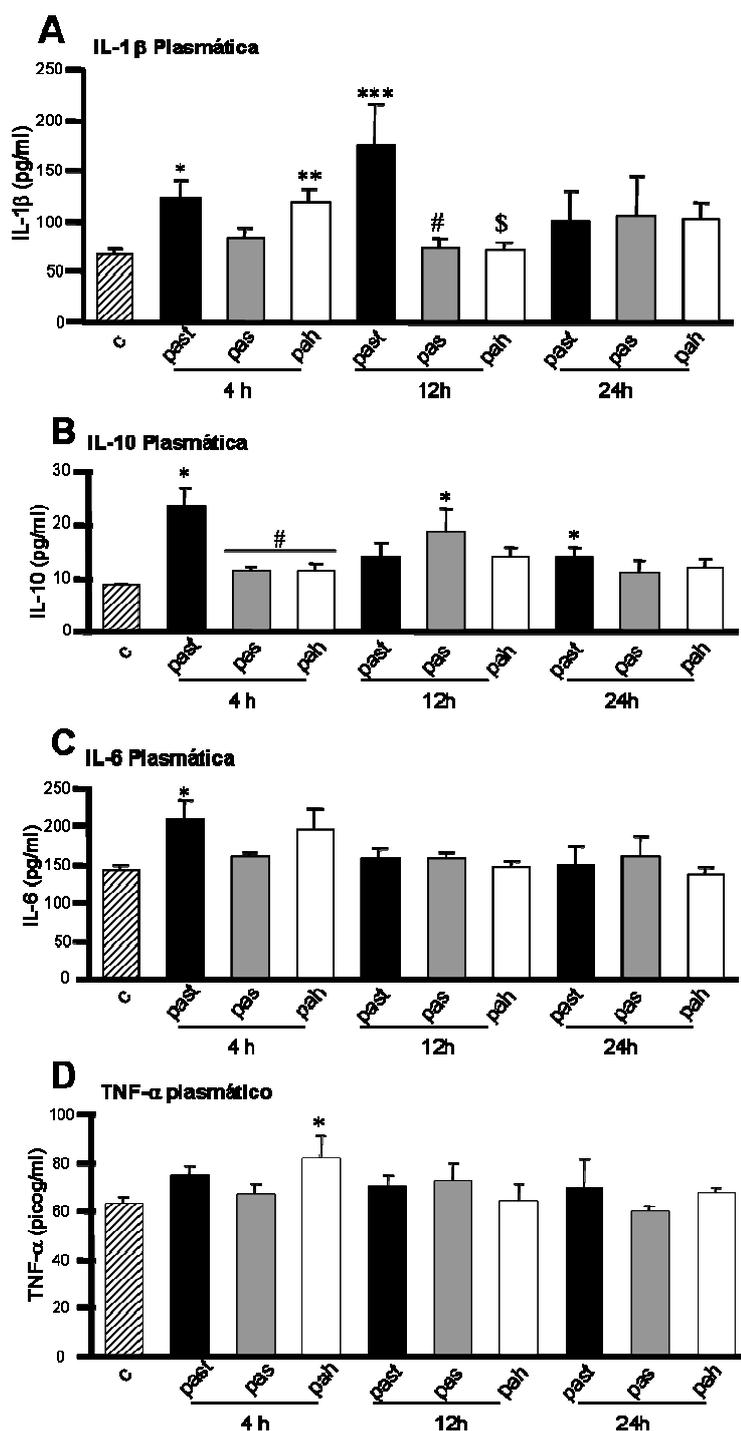


Figura 6: Citocinas Plasmáticas

Em (A) Dosagem de IL-1 β no plasma, em (B) dosagem de IL-10, em (C) dosagem de IL-6 e em (D) dosagem de TNF- α .

* $p < 0,05$ vs. c; ** $p < 0,01$ vs. c; *** $p < 0,001$ vs. c; # $p < 0,01$ vs. past12h; \$ $p < 0,001$ vs. past12h.

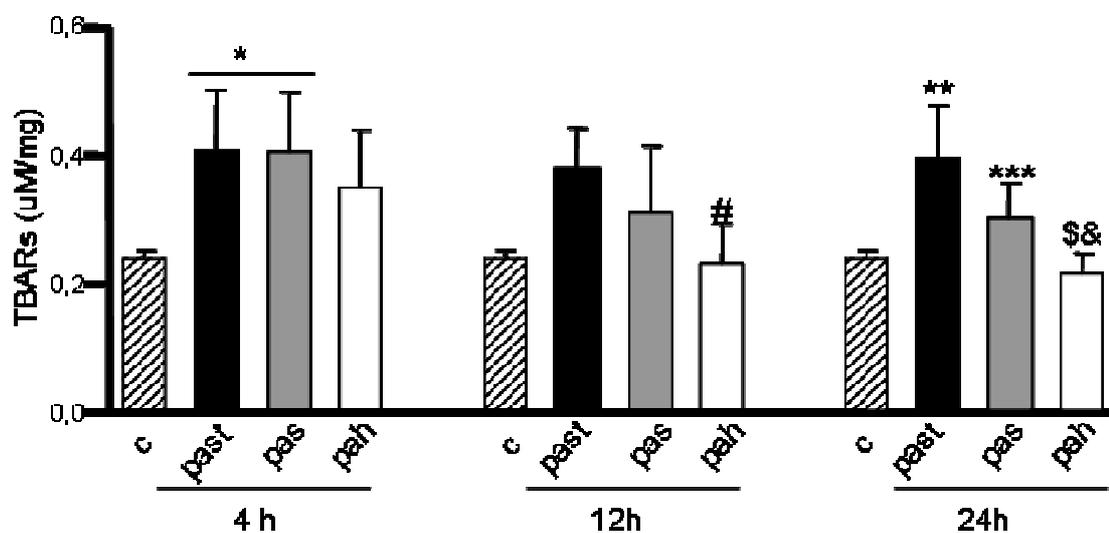


Figura 7: Peroxidação Lipídica

Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) foram determinadas em homogenatos dos grupos controle (c), submetidos à pancreatite não tratados (past), tratados com solução fisiológica (pas) ou solução hipertônica (pah). * $p < 0,05$ vs. c; # $p < 0,05$ vs. past12h; ** $p < 0,01$ vs. c; *** $p < 0,05$ vs. past24h; \$ $p < 0,001$ vs. past24h; & $p < 0,05$ vs. pas24h.

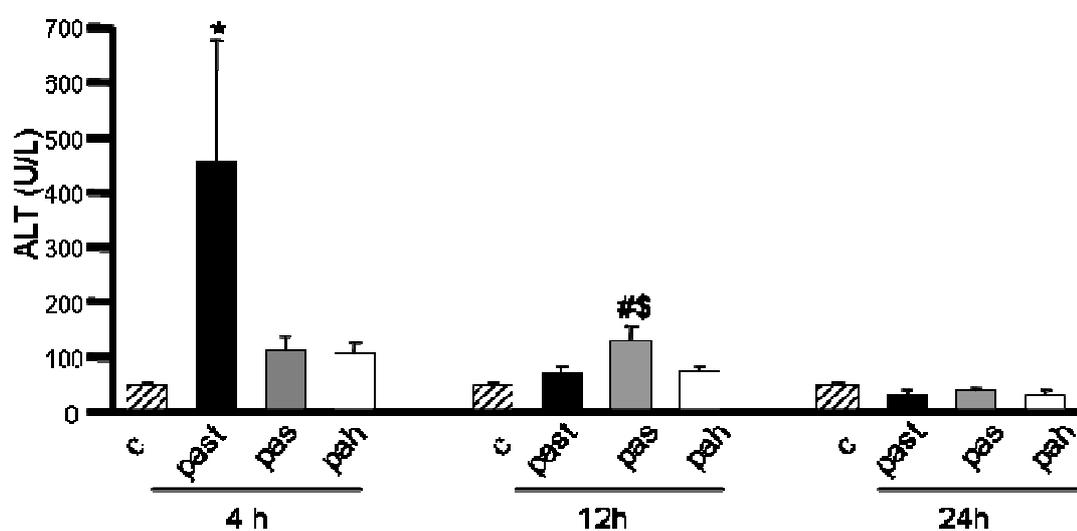


Figura 8: Atividade de Alaninoaminotransferase (ALT).

A atividade enzimática de ALT foi analisada em animais controle (c), animais submetidos à PA tratados com solução fisiológica (pas), solução hipertônica (pah) ou sem tratamento (past).

* $p < 0,05$ vs. c; # $p < 0,01$ vs. c; & $p < 0,05$ vs. pah

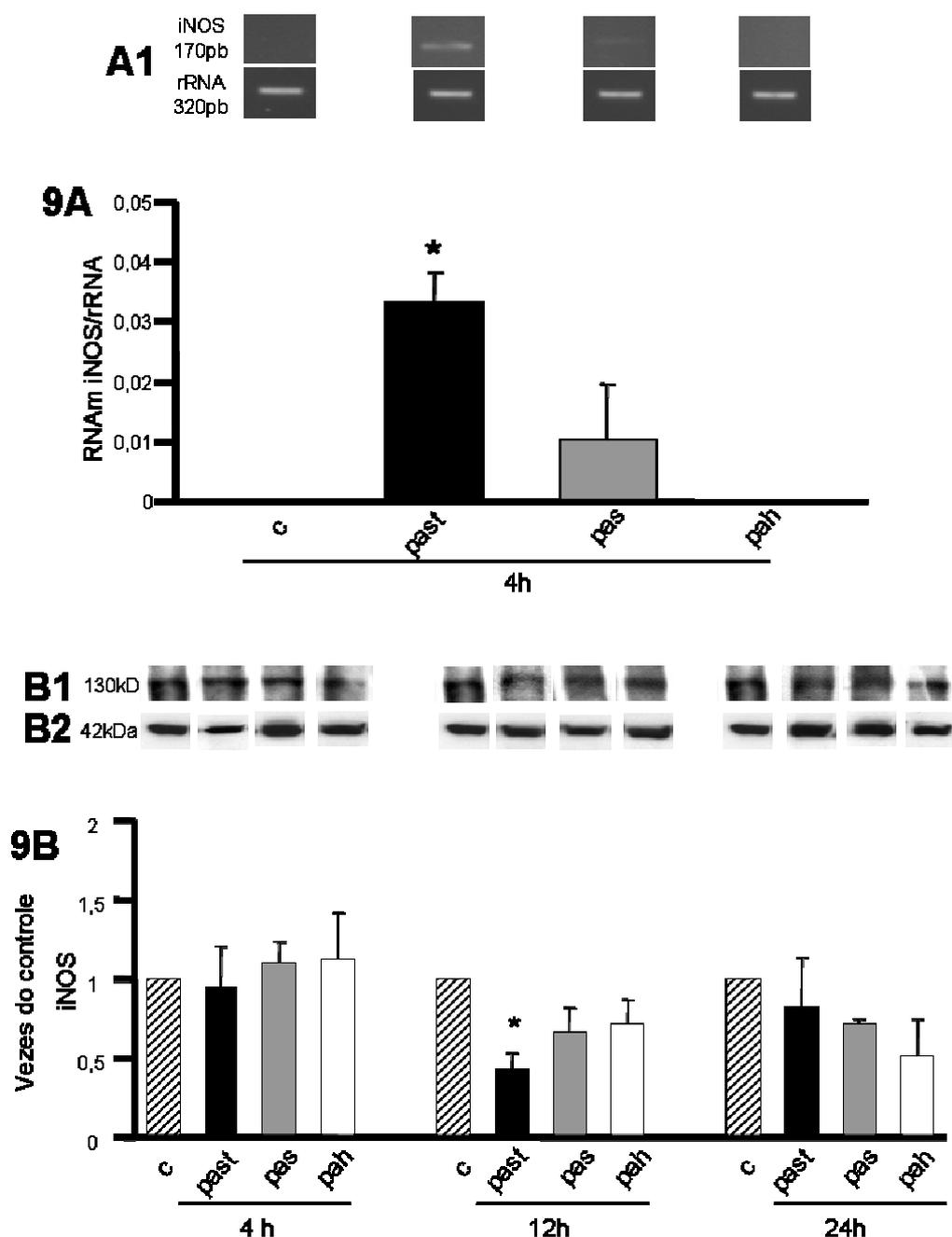


Figura 9: Expressão gênica e protéica de iNOS

A expressão gênica de iNOS (9A) foi observada somente nas primeiras 4 horas após a PA. Entretanto foi possível quantificar a expressão protéica (9B) em 4, 12 e 24 horas. (A1) Gel representativo de RNAm de iNOS (170pb) e rRNA (320pb). (B1) Filme representativo do Western Blot para expressão protéica de iNOS. (B2) β -actina foi utilizada como controle de aplicação (100 μ g de proteína por poço).

* $p < 0,05$ vs. c; # $p < 0,01$ vs. c and vs. pah

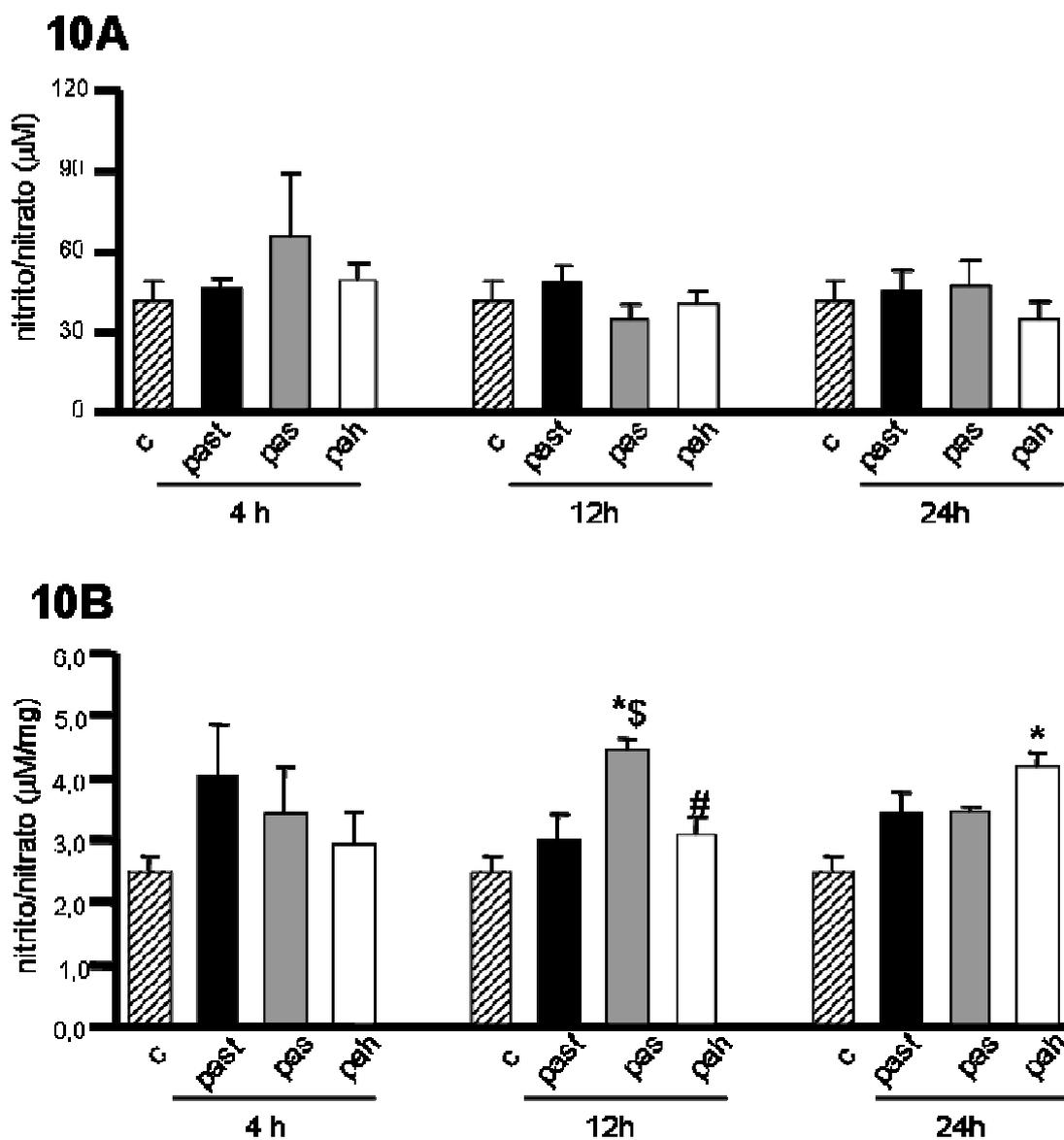


Figura 10: Produção de Nitrito e Nitrato

Concentração de nitrito e nitrato foi analisada pela reação de Griess no plasma (10A) e no homogenato de fígado (10B) de ratos controle (c), submetidos à PA e tratados com solução fisiológica (pas), solução hipertônica (pah) ou sem tratamento (past).

* $p < 0,05$ vs. c; § $p < 0,05$ vs. past; # $p < 0,05$ vs. pas

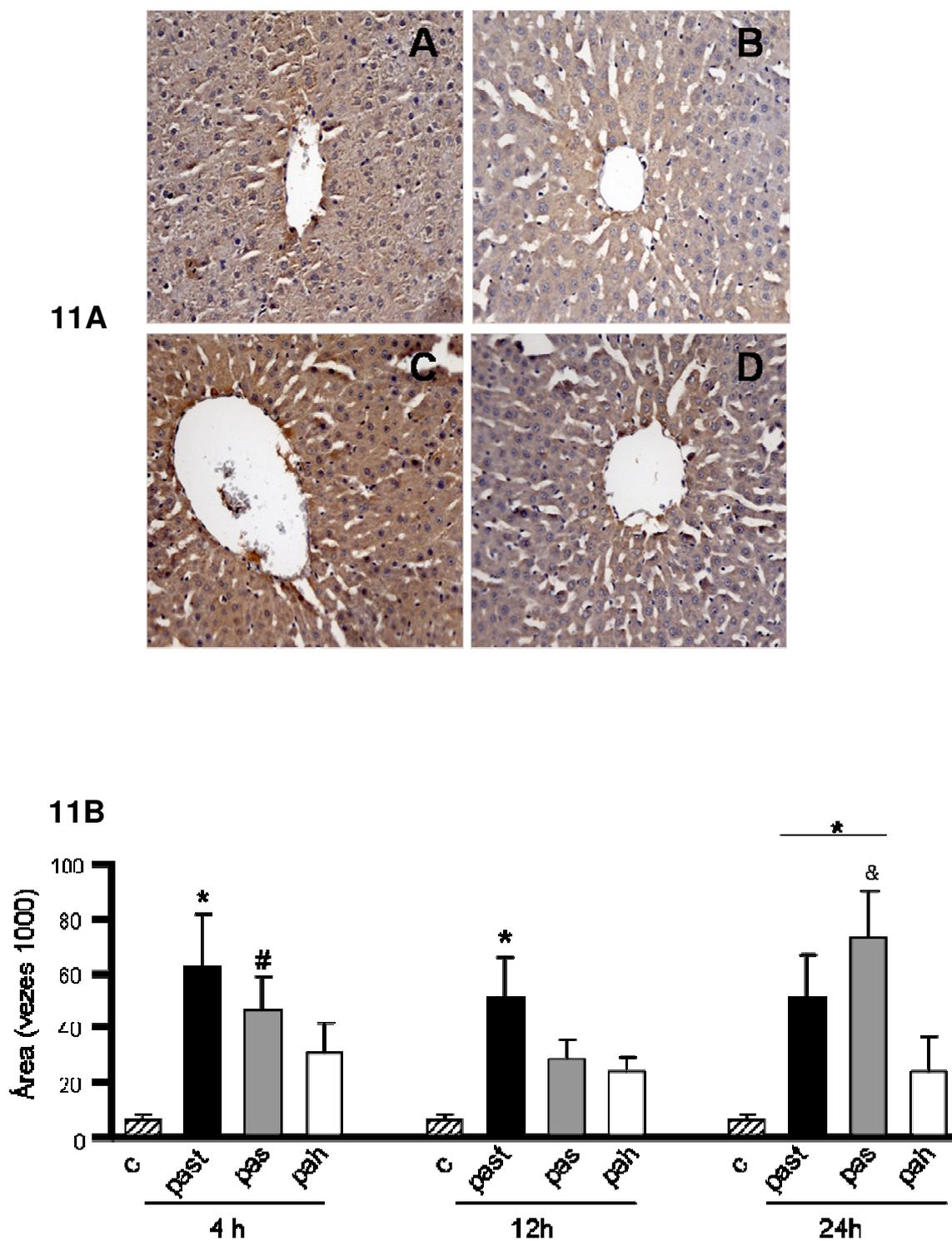


Figura 11: Expressão de nitrotirosina

Deteção de nitrotirosina (11A) em fígado de ratos dos grupos controle (A) ou submetidos à PA e tratados com SH (B), solução fisiológica (C) ou sem tratamento (D). Fragmentos de fígado foram marcados com anticorpo anti-nitrotirosina. Em 11B a área marcada foi quantificada. Aumento 200x.

* $p < 0,01$ vs. c; # $p < 0,05$ vs. c; & $p < 0,05$ vs. pah

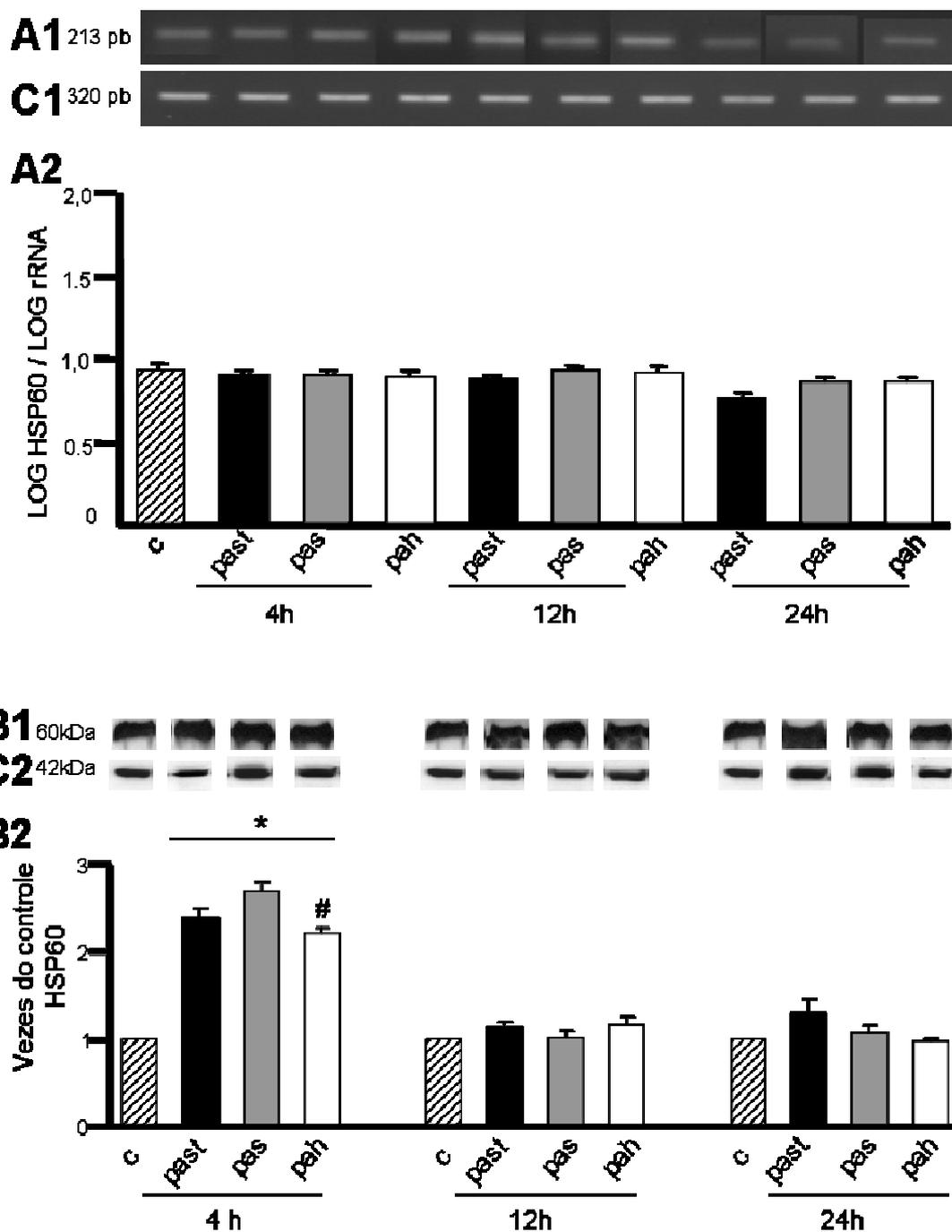


Figura 12: Expressão gênica e protéica de HSP60

A análise densitométrica da expressão gênica de HSP60 (12A2) não mostrou diferenças significativas entre os grupos. Entretanto foi possível observar mudanças na expressão protéica (12B2) em 4 horas. (A1) Gel representativo de RNAm de HSP60. (C1) rRNA (320pb). (B1) Filme representativo do Western Blot para expressão protéica de HSP60. (C2) β -actina foi utilizada como controle de aplicação (100 μ g de proteína por poço).

* $p < 0,001$ vs. c; # $p < 0,05$ vs. pas

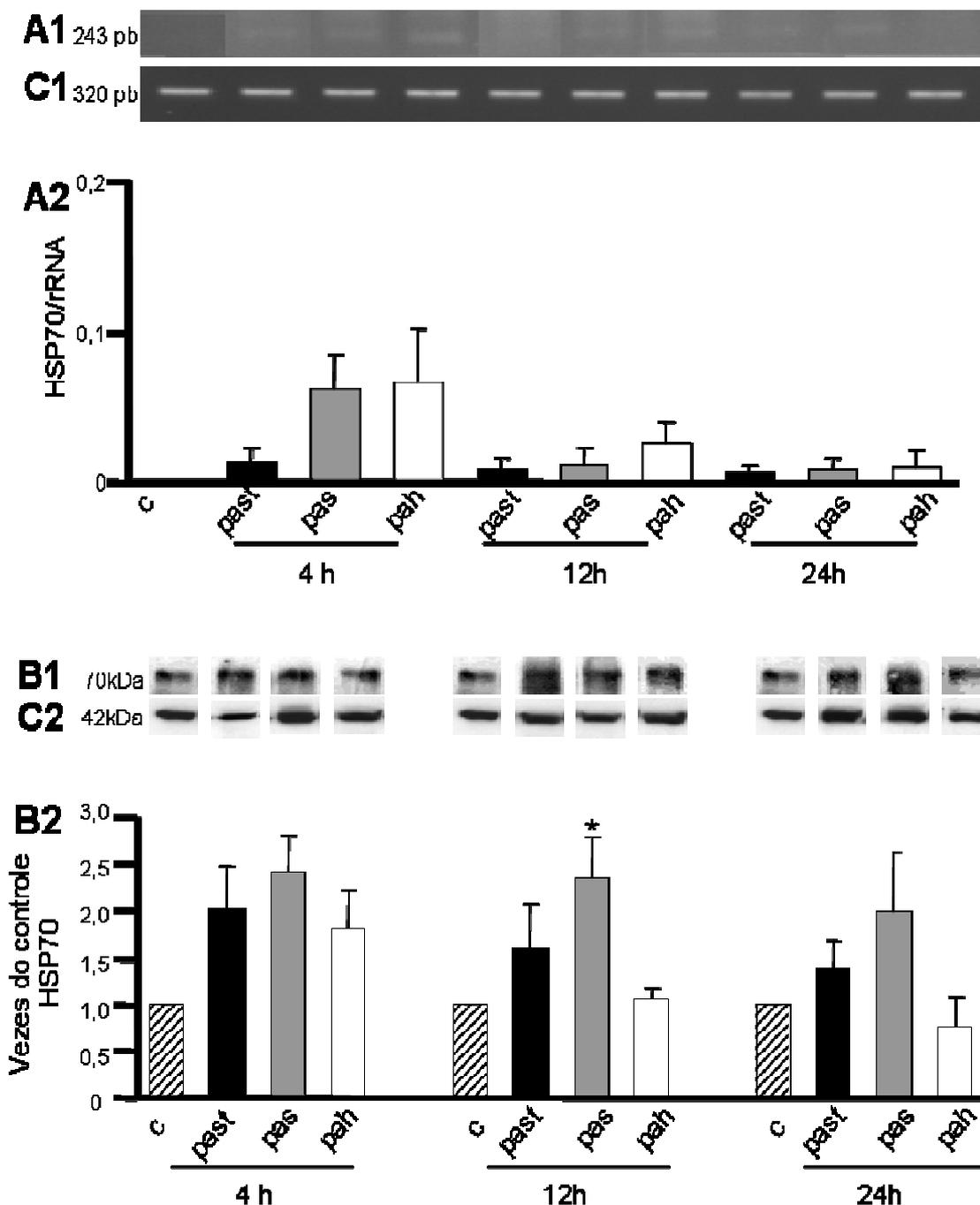


Figura 13: Expressão gênica e protéica de HSP70

Não foi possível observar diferenças significativas na expressão gênica de HSP70 (13A2). A expressão protéica de HSP70 (12B2) aumenta significativamente no grupo tratado com solução fisiológica em 12 horas. (A1) Gel representativo de RNAm de HSP70. (C1) rRNA (320pb). (B1) Filme representativo do Western Blot para expressão protéica de HSP70. (C2) β -actina foi utilizada como controle de aplicação (100 μ g de proteína por poço).

* $p < 0,05$ vs. c

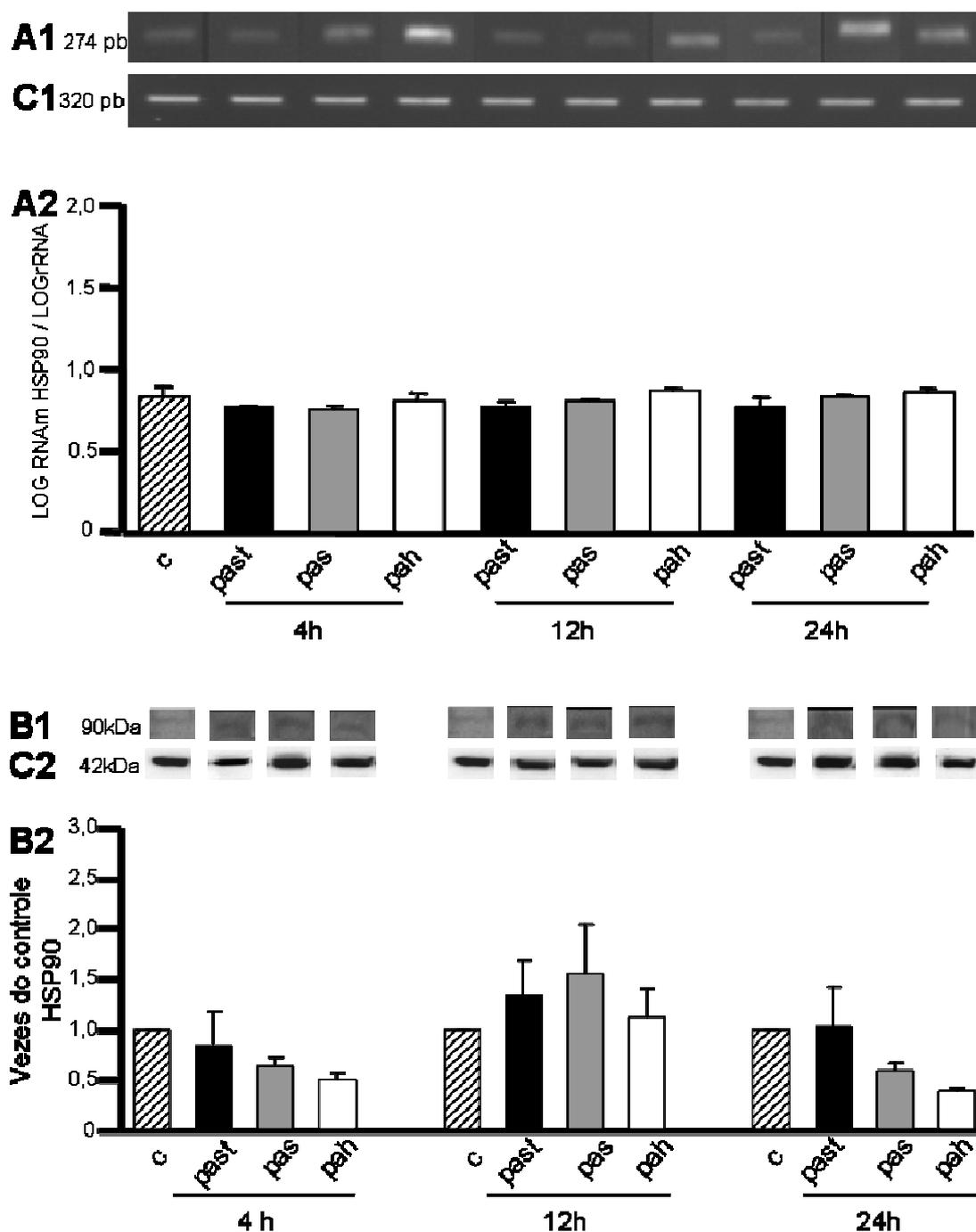


Figura 14: Expressão gênica e protéica de HSP90

A expressão gênica (A2) e protéica (B2) de HSP90 não se modifica conforme o tempo ou grupos experimentais. (A1) Gel representativo de RNAm de HSP90. (C1) rRNA (320pb). (B1) Imunoblot da expressão protéica de HSP90. (C2) β -actina foi utilizada como controle de aplicação

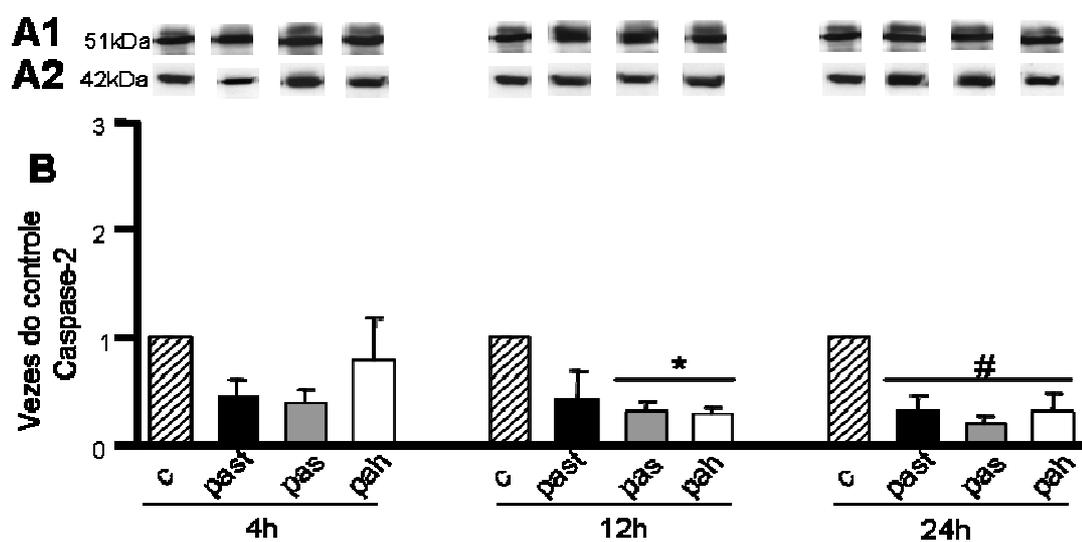


Figura 15: Expressão protéica de caspase-2

A expressão protéica (B) de caspase-2 sofre alteração após 12 e 24 horas da indução de PA. (A1) Imunoblot representativo da expressão de caspase-2L. (A2) β -actina foi utilizada como controle de aplicação (100 μ g de proteína por poço).

* $p < 0,05$ vs. c, # $p < 0,01$ vs. c.

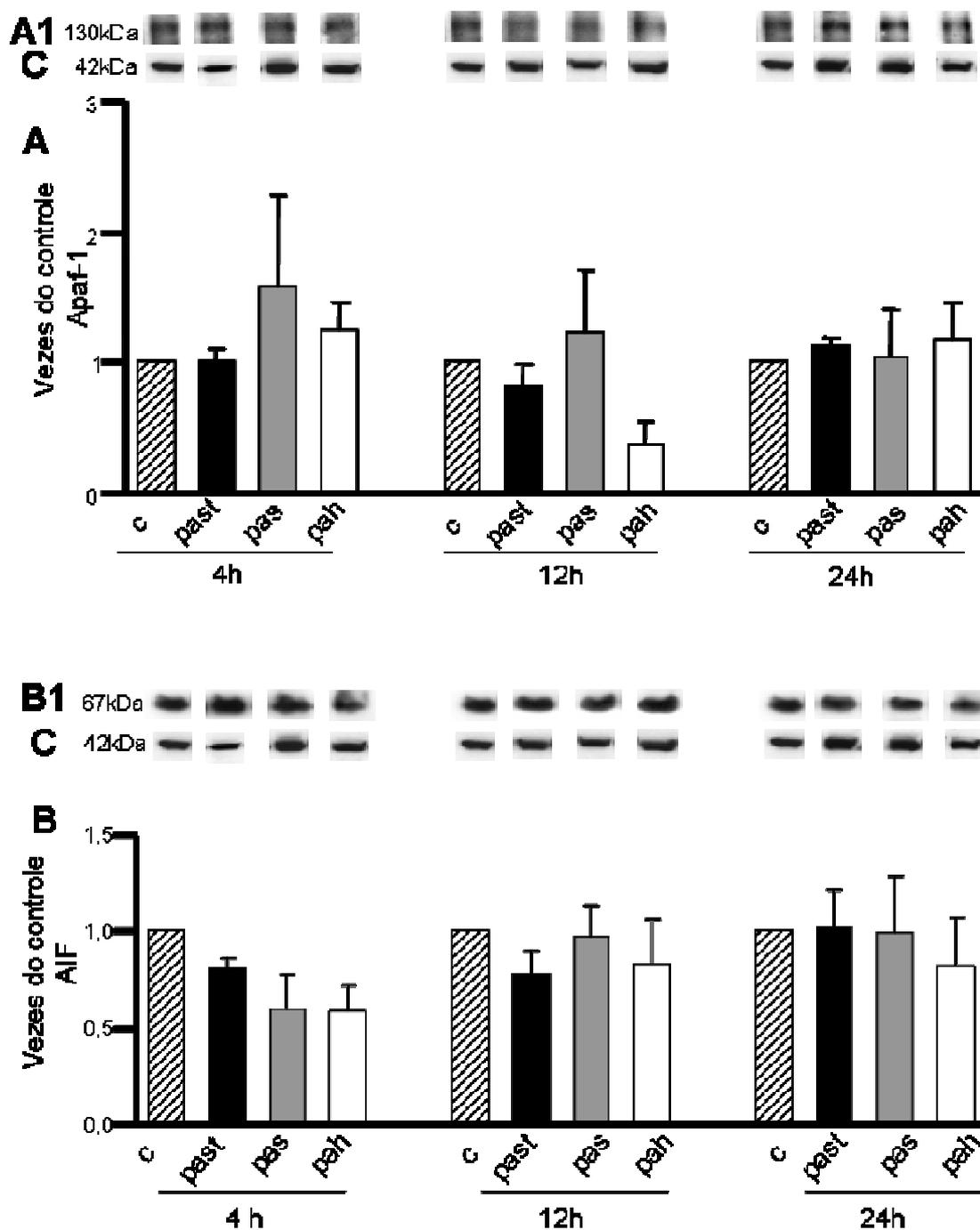


Figura 16: Expressão protéica de APAF-1 e AIF

A expressão do Fator Apoptótico Ativador de Protease (APAF-1) (A) e do Fator Indutor de Apoptose (AIF) (B) não se modifica conforme o tempo ou grupo experimental. (A1) Imunoblot representativo da expressão de APAF-1 (130kDa). (B1) Imunoblot da expressão protéica de AIF (67kDa). (C) β -actina foi utilizada como controle de aplicação (100 μ g de proteína por poço).

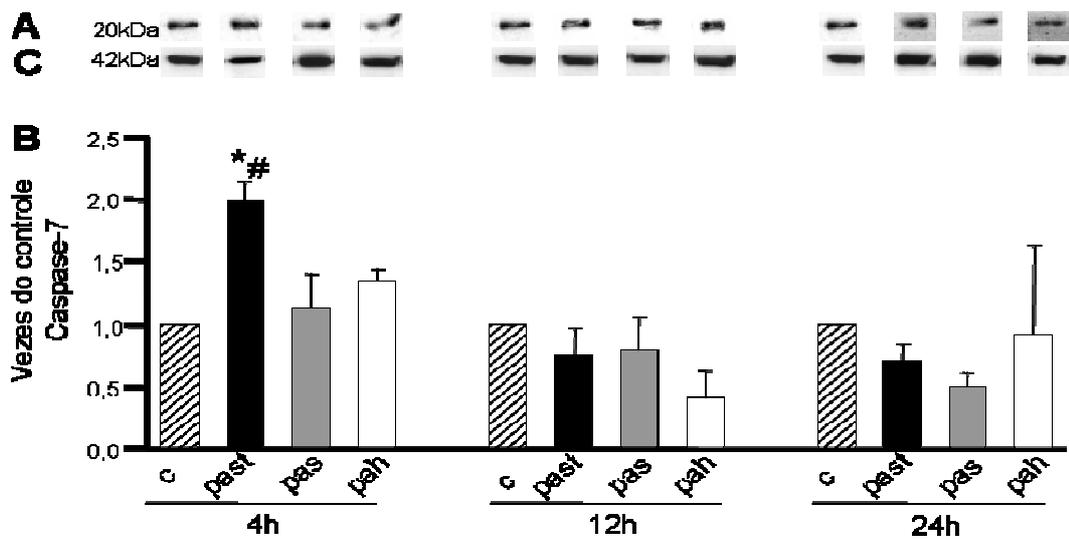


Figura 17: Expressão protéica de Caspase-7

A desintometria dos géis mostra que expressão protéica de caspase-7 (B) se modifica após as primeiras horas da indução de PA. (A) Imunoblot representativo da expressão de caspase-7 (20kDa). (C) β -actina foi utilizada como controle de aplicação (100 μ g de proteína por poço).

* $p < 0,01$ vs. c; # $p < 0,05$ vs. pas4h

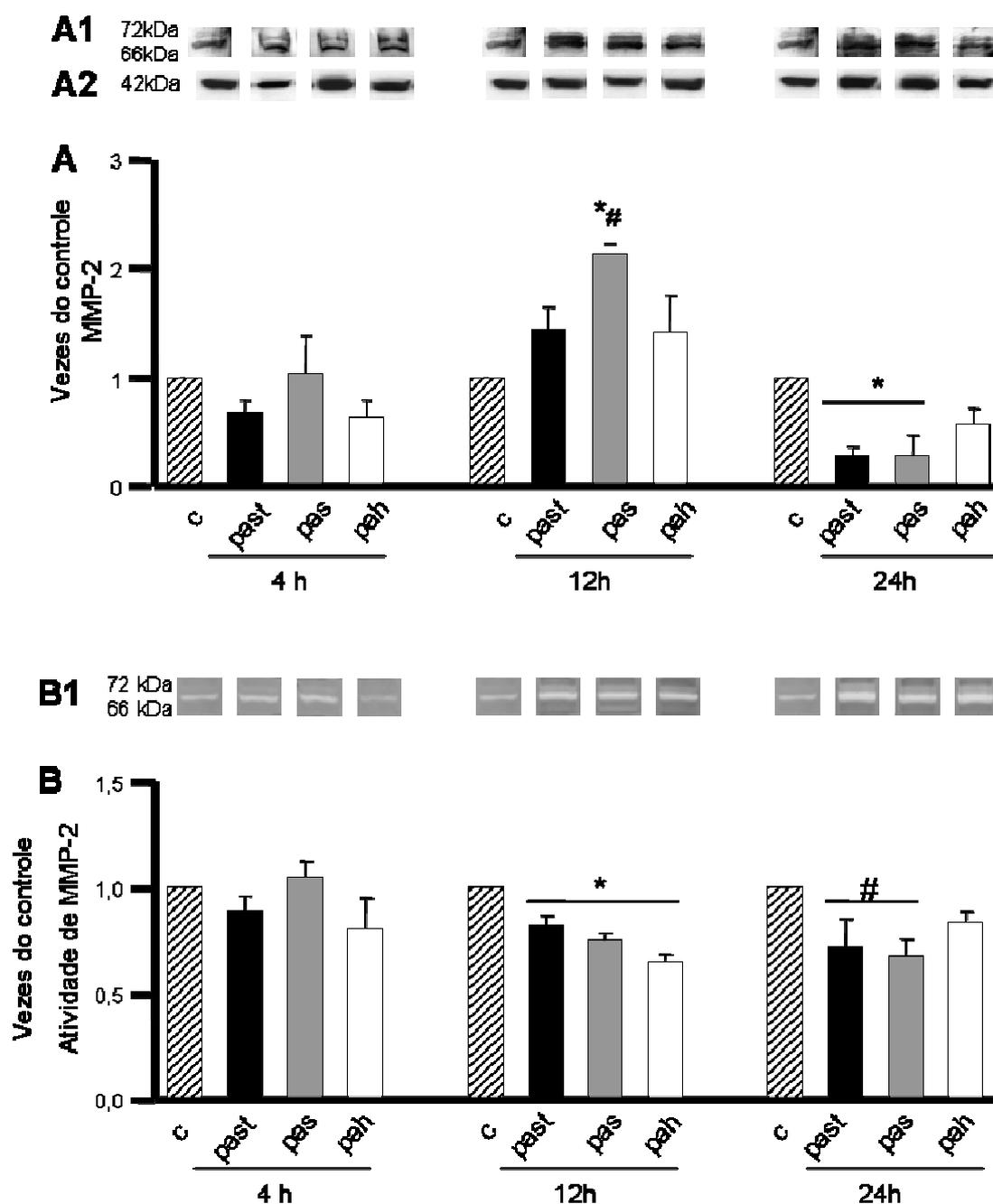


Figura 18: Expressão e atividade de MMP-2

Expressão protéica (A) e atividade (B) de MMP-2 em fígados de ratos após 4, 12 e 24 horas da indução de PA. (A1) Western blot representativo da expressão protéica de MMP-2. (A2) β -actina foi utilizada como controle de aplicação (100 μ g de proteína por poço). (B1) Formas ativas (66kDa) e latentes (72kDa) de MMP-2 identificadas em zimografia.

* $p < 0,01$ vs. c; # $p < 0,05$ vs. past

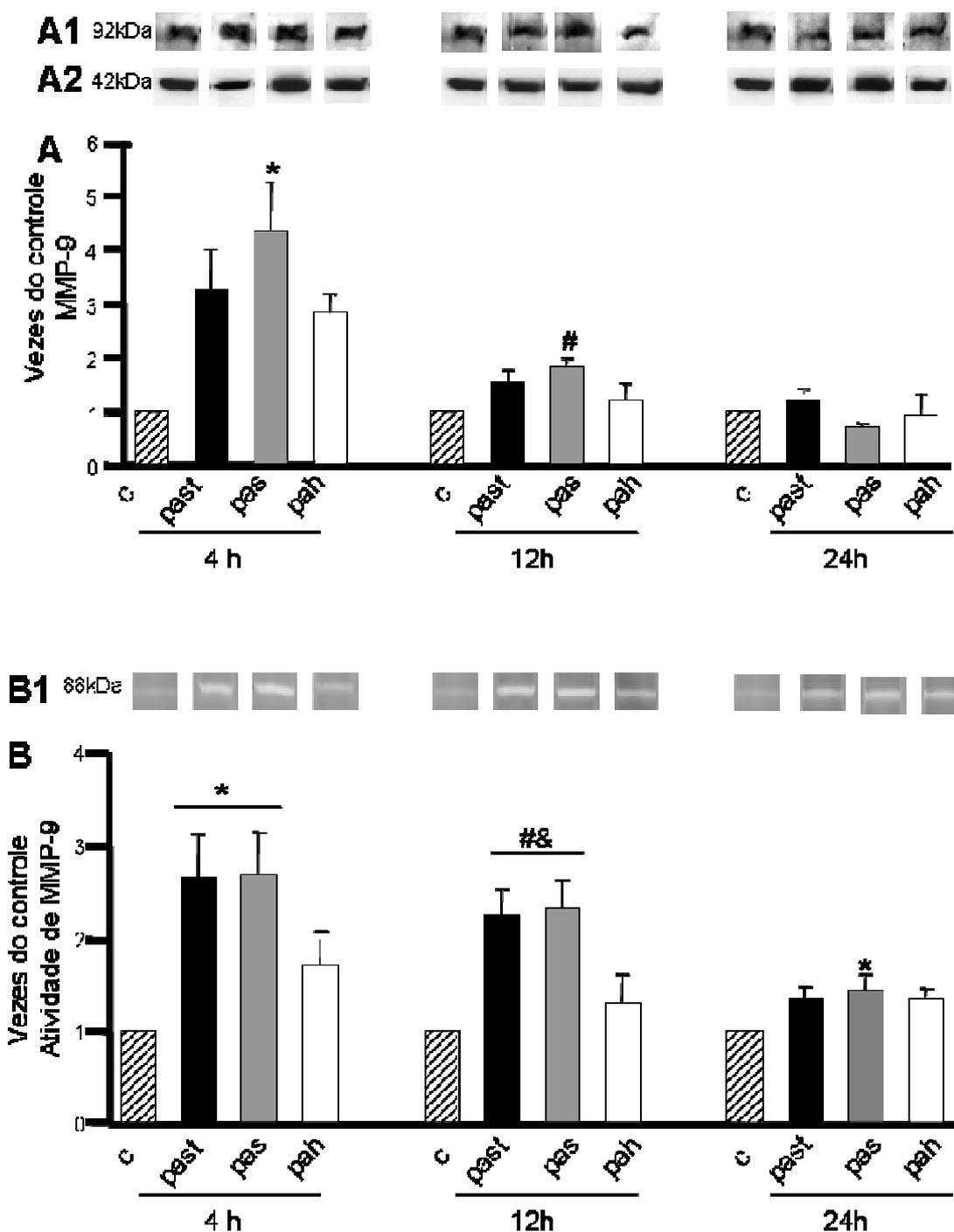


Figura 19: Expressão e atividade de MMP-9

Expressão protéica (A) e atividade (B) de MMP-9 hepática após 4, 12 e 24 horas da indução de PA. (A1) Imunoblot representativo da expressão protéica de MMP-9. (A2) β -actina foi utilizada como controle de aplicação (100 μ g de proteína por poço). (B1) Forma ativa (88kDa) de MMP-9 identificadas em zimografia.

* $p < 0,05$ vs. c; # $p < 0,01$ vs. c; & $p < 0,05$ vs. pah

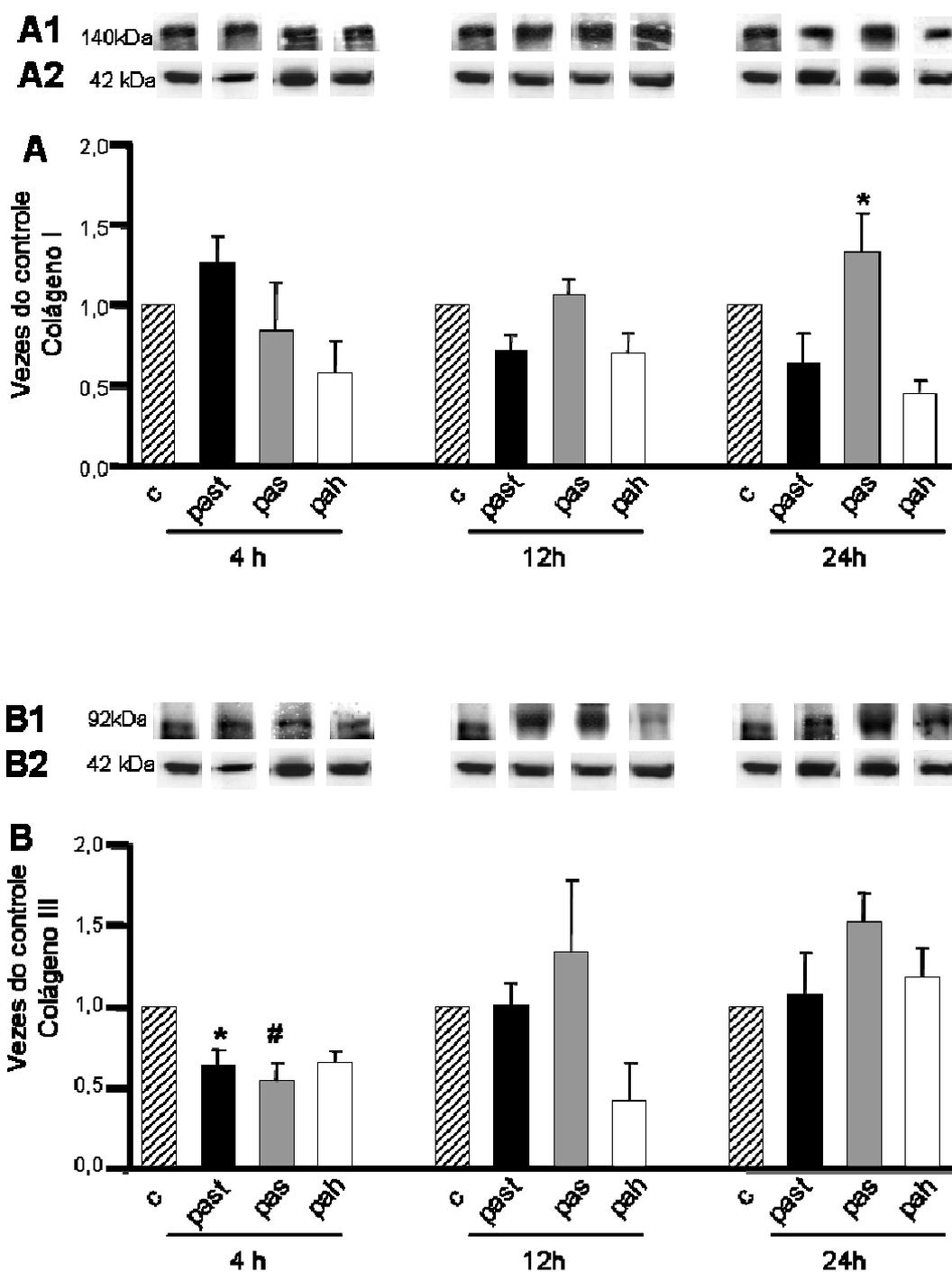


Figura 20: Expressão protéica dos colágenos tipos I e III

Expressão de colágeno tipo I (A) e tipo III (B) foram analisados nos homogenatos de fígado. A1 e B1 mostram filmes representativos de western blot para colágeno I e III, respectivamente. A2 e B2 mostram imunoblot de β -actina, utilizada como controle de aplicação (100 μ g de proteína por poço).

* $p < 0,05$ vs. c; # $p < 0,01$ vs. c

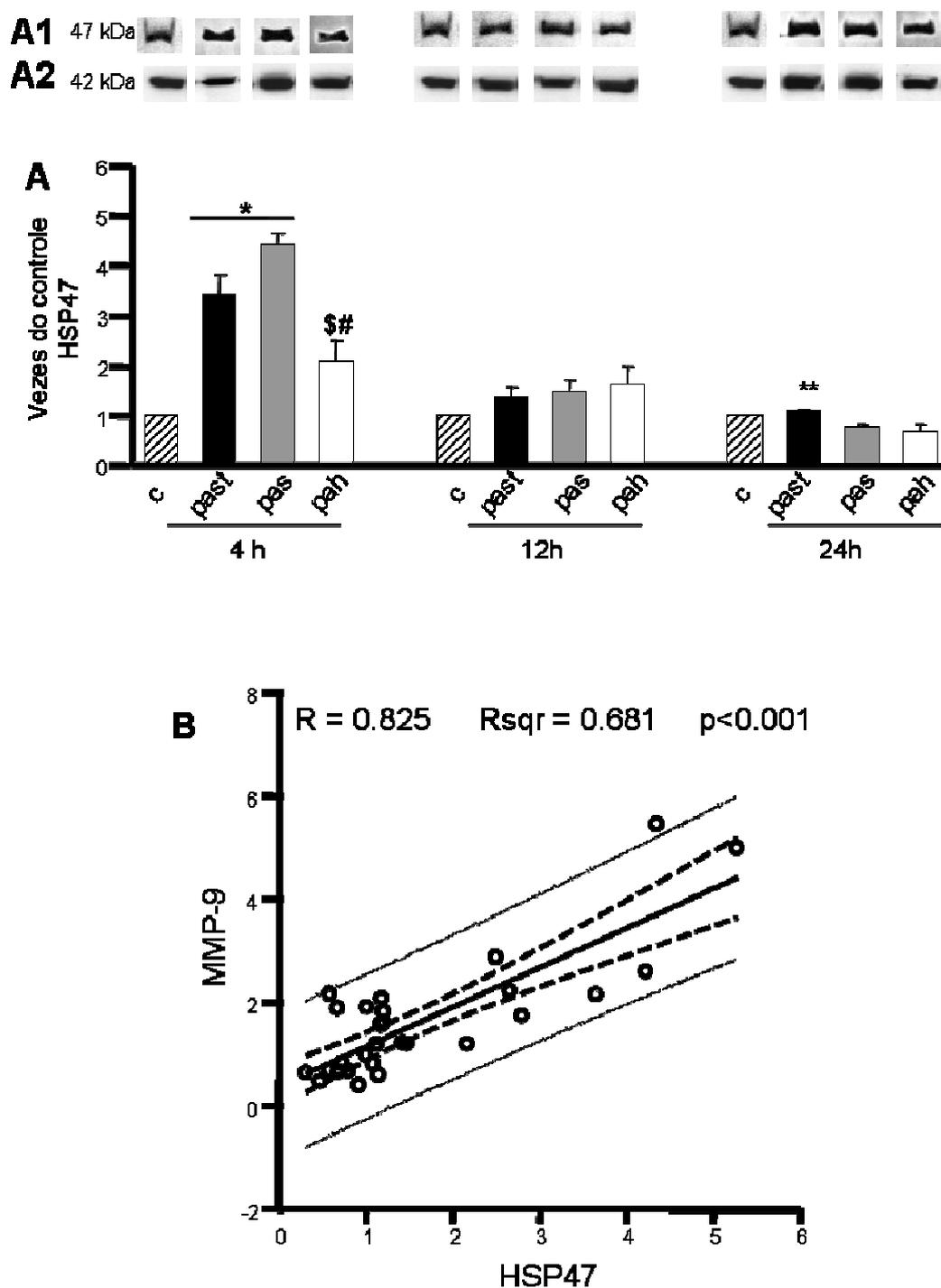


Figura 21: Expressão protéica de HSP47

Expressão hepática de *Heat Shock Protein 47* (A). (A1) Western blot representativo da expressão protéica de HSP47. (A2) Imunoblot de β -actina, utilizada como controle de aplicação (100 μ g de proteína por poço). (B) Correlação direta entre expressão de HSP47 e MMP-9 ($R=0,825$, $p<0,001$, $n=30$).

* $p<0,001$ vs. c; \$ $p<0,05$ vs. pah; # $p<0,01$ vs. pah; ** $p<0,05$ vs. pah e past

Discussão

6. DISCUSSÃO

A PA é uma doença que acomete, além dos tecidos pancreáticos, órgãos distantes e continua a ser um desafio na clínica médica ¹²⁹. Muitos autores descreveram as alterações locais que ocorrem durante a PA. Entretanto, no presente estudo nós investigamos os efeitos benéficos da solução hipertônica utilizada isoladamente no tratamento da lesão no fígado, órgão primariamente comprometido nas doenças gastrointestinais ⁴².

A indução de PA provocou alterações sistêmicas e teciduais na produção de citocinas. Os animais com PA que não receberam tratamento apresentam um aumento das interleucinas IL-6, IL-10 e IL-1 β no plasma em 4 horas, além de um pico de citocinas em 12 horas, com o aumento de IL-1 β no plasma e de IL-10 no tecido. Os animais tratados com solução fisiológica apresentam um pico inicial de IL-1 β no fígado e, posteriormente de IL-10, em 12 horas no plasma e em 24 horas no tecido. Outros estudos também demonstraram um aumento de IL-6 e IL-10 no plasma em animais submetidos à PA que receberam ou não algum tratamento ¹³⁰.

O perfil de citocinas hepáticas mostra que a SH mantém os níveis basais de citocinas teciduais em todos os horários. No plasma, ocorre um ligeiro aumento em 4 horas nos níveis de TNF- α e IL-1 β . Sabe-se que essas citocinas são as principais mediadoras da resposta inflamatória rápida, e que de maneira controlada podem induzir a liberação de NO, importante na manutenção da perfusão hepática e na prevenção da apoptose no fígado ¹³¹.

A PA induziu a expressão de caspase-7, mas não de caspase-2 e Apaf-1, ligados à via intrínseca de indução de apoptose, bem como de AIF. Ambos os tratamentos, com solução fisiológica ou hipertônica, foram eficazes em manter a expressão basal de caspase-7. Sabe-se que a regulação na transcrição de caspases pode interferir no potencial apoptótico¹³²⁻¹³⁴. Entretanto, o controle da apoptose deve-se mais à ativação das caspases do que à regulação de seus níveis protéicos intracelulares¹³⁵, ou seja, a cascata de eventos que levam à apoptose pode sofrer regulação em diversos níveis e pode ser revertida nos estágios iniciais⁴⁴. Além disso, deve-se considerar a atividade das caspases e sua relação com o NO. A nitrosilação das caspases, por exemplo, pode modular a atividade dessas proteínas, que por sua vez vão interferir na via final da apoptose¹³⁶.

A SH modula a transcrição de iNOS mas não a síntese protéica no período observado. Entretanto, a regulação da transcrição nem sempre está associada à redução da atividade biológica ou da expressão protéica¹³⁷. Além disso, sabe-se que a iNOS pode ser inibida pela ligação com outras proteínas¹³⁸ e que em alguns casos, a formação de um complexo entre iNOS e caveolina-1 promove proteólise de iNOS¹³⁹. Portanto, a regulação do NO pela SH no presente trabalho ocorre independente da expressão protéica. Entretanto, no grupo que não recebeu tratamento ocorre inicialmente um aumento significativo na expressão gênica de iNOS o que provavelmente acarretou em um "*feedback*" negativo, com a consequente redução na expressão protéica após 12 horas.

Embora a expressão gênica basal de iNOS mostre-se reduzida, a expressão protéica mostra níveis basais mais elevados, isto ocorre possivelmente devido à indução contínua de iNOS hepática causada por constante estímulo aos hepatócitos com produtos bacterianos ou químicos que são absorvidos pelo intestino para circulação portal e então distribuídos no fígado ¹⁴⁰. A diferença entre a expressão gênica e protéica de iNOS pode ser explicada devido aos efeitos diretos das toxinas intestinais às quais os hepatócitos são expostos, ou seja, a geração de NO por iNOS pode ser rapidamente disponibilizada para as reações locais de defesa e imunidade inespecífica. Outros autores demonstraram que em culturas celulares, iNOS foi rapidamente induzida por citocinas em células de Kupffer ¹³¹.

Apesar da expressão de iNOS inalterada entre controle e grupos tratados, os níveis de nitrito e nitrato se modificam. Esta discrepância entre atividade e expressão de iNOS já foi verificada em outros tipos de patologias, como inflamação induzida por hipóxia em ratos ¹⁴¹. Deve-se considerar a estabilidade do RNAm e das próprias proteínas ¹⁴². A atividade da proteína depende também de uma regulação por fosforilação. As citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios ativam uma via de PI3P, Akt que fosforila as NOS e aumenta sua atividade ¹⁴³.

O estresse oxidativo é um evento importante nos primeiros estágios da inflamação sistêmica que ocorre durante a PA ^{1, 144-145} e o fígado é um importante alvo do desequilíbrio redox neste processo ³¹. No presente trabalho, a peroxidação lipídica no tecido hepático não foi diferente entre o grupo controle e o grupo tratado com SH. É importante notar que no grupo

tratado com solução fisiológica, os níveis de peroxidação lipídica aumentaram paralelamente ao aumento dos níveis de nitrito e nitrato. Sabe-se que a interação de NO com radicais livres tem um profundo impacto na química de lipídios, pois a peroxidação lipídica é uma reação em cadeia iniciada pela interação de diversas espécies oxidantes como peroxinitrito, radical hidroxila e outros que alteram a membrana celular levando à formação de mediadores lipídicos pró-inflamatórios ¹⁴⁶.

NO e seus subprodutos exercem um importante papel na fisiologia da inflamação, e podem ser protetores ou danosos ao fígado. NO promove morte hepatocelular em condições de estresse oxidativo e, em contraste, NO é hepatoprotetor em condições normais ^{33, 131}. Interessantemente, o grupo que recebeu SH apresentou redução na peroxidação lipídica durante as 24 horas de estudo, uma redução dos níveis de nitrito e nitrato em 12 horas que aumenta em 24 horas. Estes resultados sugerem que a modulação do NO pela SH é hepatoprotetora ¹³¹ uma vez que este tratamento previne o estresse oxidativo.

Os efeitos do NO e seus subprodutos são complexos, uma vez que devemos considerar a interação com o superóxido no efeito final. Sabe-se que, na presença de altas concentrações de superóxido, a formação de peroxinitrito depende da produção de NO ¹⁴⁷. Isso acontece nos grupos com PA sem tratamento ou tratados com solução fisiológica, onde ocorre o aumento da peroxidação lipídica concomitante ao aumento de nitrito e nitrato. Nesta linha de pensamento, com baixas concentrações de superóxido, a elevação de NO não induz formação de peroxinitro e os efeitos

regulatórios de NO predominam. Por outro lado, com o aumento de superóxido predominam os efeitos danosos do peroxinitrito ¹⁴⁸. Um dos principais efeitos tóxicos do peroxinitrito é nitração de macromoléculas através de sua ação de oxidação seletiva ¹⁴⁹, contribuindo para necrose ou apoptose ¹⁵⁰. A formação de nitrotirosina é uma consequência da atividade do peroxinitrito e o aumento dos níveis de nitrotirosina tem sido detectado em diversas doenças humanas associadas ao estresse oxidativo ¹⁵¹. A indução de PA aumentou a nitração de proteínas hepáticas em 4 horas nos grupos sem tratamento ou tratados com solução fisiológica. Essa observação sugere que um dos mecanismos de lesão durante o pico inflamatório da PA é a reação de NO com superóxido para a formação de peroxinitrito. O aumento da peroxidação lipídica concomitante ao aumento da nitração de proteínas no grupo tratado com solução fisiológica indica que os efeitos danosos do NO ocorrem quando há um aumento do estresse oxidativo. Entretanto, o tratamento com SH atenuou a lesão hepática associada à PA com a redução da nitrotirosina. Uma das limitações deste trabalho foi a ausência de uma prova da relação direta entre modulação do NO e a melhora ou piora dos parâmetros estudados. Entretanto, demonstramos a formação de nitrotirosina durante o pico inflamatório nos grupos submetidos à PA que não receberam SH.

O aumento nos níveis plasmáticos de ALT nos grupos tratados com solução fisiológica ou sem tratamento indica lesão hepatocelular, evento não observado nos grupos tratados com SH. A lesão da membrana plasmática, produzida pela peroxidação lipídica inicialmente, pode ter causado a

liberação das enzimas citosólicas (ALT) no plasma. Além disso, observamos um aumento na expressão de HSP70 nos animais tratados com solução fisiológica. Este grupo exibiu um pico inflamatório 12 horas após a indução de PA, quando houve um aumento da maioria dos mediadores inflamatórios estudados. Machado e colaboradores ¹³⁰ também demonstraram um pico inflamatório em 12 horas no modelo de PA, com o aumento da produção de citocinas e ALT nos animais tratados com solução fisiológica ou sem tratamento. Semelhantemente ao nosso estudo, eles não observaram este pico inflamatório nos animais tratados com SH. As *Heat-shock proteins* (HSP) são produzidas em resposta ao estresse e reguladas por um fator inativo em condições normais ¹⁵². Li e Billiar ¹³¹ mostraram que pré-tratamento com doadores de NO ou pré-indução de iNOS estimulou a expressão de HSP70 em hepatócitos. No presente trabalho, A SH protegeu o fígado contra lesão por estresse oxidativo nos estágios iniciais após a indução de PA, portanto a produção de HSP70 não foi ativada.

Strowski e colaboradores ¹⁵³ demonstraram que pancreatite induzida por ceruleína aumenta RNAm para HSPs, mas reduz os níveis protéicos. Nosso modelo experimental de PA não altera o perfil gênico de HSPs 60 e 90, mas provoca alterações na expressão protéica, aumentando a expressão de HSP60 em 4 horas. Essa proteína está envolvida na regulação do sistema imune ativando células via “toll-like receptors”, causando a liberação de NO. O aumento significativo de HSP60 em 4 horas no grupo tratado com solução fisiológica poderia provocar o aumento de NO neste grupo em 12 horas. HSP60 inicia uma resposta inflamatória potente nas células do sistema

imune inato, sendo liberada do interior das células durante a necrose ¹⁵⁴. Entretanto, Cumming e colaboradores ¹⁵⁵ observaram que a super-expressão gênica de HSP60 não aumentou a sobrevivência no estresse metabólico. O tratamento com SH mantém o equilíbrio sistêmico das citocinas e HSPs.

Apesar dos efeitos benéficos de atenuação do estresse oxidativo observados no grupo tratado com SH comparado ao grupo tratado com solução fisiológica, nós não observamos diferenças entre animais controles ou tratados com SH e o grupo não tratado nas análises de nitrito/nitrato, ALT ou HSP70 doze horas após a indução de PA. Este dado pode ser explicado pelo fato de que o sistema antioxidante hepático foi eficaz em manter o balanço redox nos animais dos grupos controle e SH. De fato, diversos estudos mostraram que SH modula as defesas antioxidantes ^{156,157}. Entretanto, no grupo que não recebeu tratamento houve uma lesão grave nas primeiras horas após a PA, com aumento de ALT, subprodutos de NO e peroxidação lipídica seguida por uma redução em 12 horas. Apesar do número reduzido de estudos mostrando o perfil de um grupo submetido à PA ou lesão hepática e não tratado, nós hipotetizamos que a intensa, rápida e transiente liberação de EROs pelo fígado no início da pancreatite leva à uma inflamação no órgão e conseqüente aumento da morbidade e mortalidade ¹³⁰. Esta hipótese é corroborada pelo aumento da expressão de nitrotirosina 12 e 24 horas após a indução de PA. Além disso, sabe-se que a ativação celular induzida por EROs pode ser reduzida após a uma intensa lesão inicial ¹⁵⁸ como a que ocorreu no grupo não tratado.

A inflamação sistêmica decorrente da PA envolve múltiplas vias e não pode ser explicada por um único mediador. Estresse oxidativo e peroxidação lipídica podem constituir uma via comum que leva à ativação das CEH durante a lesão no fígado ¹¹⁵. Dessa ativação podem ocorrer alterações nos componentes da MEC, envolvendo degradação e fibrogênese ⁵⁴. No espaço extracelular, a degradação ocorre predominantemente como consequência da ação das MMPs ¹⁵⁶. Diversos autores demonstraram que as MMPs contribuem para o desenvolvimento do processo inflamatório e estão associadas às lesões locais e em órgãos distantes ⁶⁹. Nas fases agudas da lesão hepática, há um aumento na expressão das MMPs, que degradam a matriz extracelular do fígado e podem contribuir para a patogênese das doenças hepáticas ¹⁵⁹.

O presente trabalho demonstrou que a indução de PA resultou no aumento da expressão protéica de MMP-2 em 12 horas nos animais tratados com solução fisiológica. A atividade de MMP-2 também foi alterada em 12 horas em todos os grupos submetidos à PA e em 24 nos grupos tratados com solução fisiológica ou não tratados. O aumento na atividade dessa enzima, decorrente do aumento de sua expressão, ocorreu provavelmente em um horário intermediário aos horários estudados, provocando a redução observada, uma vez que a regulação das MMPs pode ocorrer tanto no nível transcricional quanto através da ativação das pró-enzimas ¹³⁷. Entretanto, foi possível observar que o tratamento com SH induziu a recuperação da atividade de MMP-2.

A expressão protéica de MMP-9 aumentou nos animais que receberam solução fisiológica após a indução de PA. A atividade de MMP-9 aumentou significativamente em 4 e 12 horas nos grupos tratados com solução fisiológica e sem tratamento. O acúmulo de proteínas da MEC é resultado da cicatrização hepática em resposta à agressão repetitiva ⁶⁹. SH reduziu significativamente a expressão e atividade de MMP-9 comparado aos grupos que receberam solução fisiológica e sem tratamento. Nossos resultados mostram que o tratamento com SH após a indução de PA contribuiu significativamente para a manutenção do balanço entre expressão e atividade de MMPs na MEC, diminuindo lesão hepática decorrente da inflamação.

Alterações na regulação da maquinaria enzimática envolvida na degradação da MEC é um fator que contribuiu para a patogênese de muitas doenças hepáticas ¹³⁷. O principal componente da matriz extracelular do fígado normal é o colágeno (tipos I, III, IV e V) que, no presente estudo, não difere entre os grupos controle e tratado com SH. É importante notar que nos grupos tratados com solução fisiológica ou não tratados, a quantidade de colágeno tipo III diminuiu paralelamente ao aumento da atividade de MMP, provavelmente devido à digestão resultante do aumento da atividade dessas enzimas nesses grupos.

A fim de entender como a matriz extracelular responde à degradação, nós estudamos a HSP47. No fígado, as CEH produzem as proteínas da matriz e são responsáveis pela expressão de HSP47 ⁸⁹, uma proteína intracelular capaz de se ligar à gelatina e aos colágenos tipos I e IV. Além

disso, HSP47 exerce uma função importante na síntese e regeneração de proteínas hepáticas. A expressão preferencial de HSP47 nas CEH é correlacionada à capacidade dessas células gerarem colágeno ¹⁶⁰.

A expressão de HSP47 aumenta nos grupos que não receberam tratamento ou tratados com solução fisiológica, entretanto permanece nos níveis basais no grupo tratado com SH. A forte correlação positiva entre expressão de HSP47 e MMP-9 sugere que a degradação tecidual pelas MMPs induz a produção de colágeno e aumento da expressão de HSP47 na lesão hepática. Corroborando estes dados, observamos em nosso estudo o aumento da expressão de colágeno tipo I após 24 horas da indução de PA no grupo que recebeu solução fisiológica. O remodelamento tecidual após lesão, ou seja, o processo de cicatrização associado às lesões repetitivas foi maior nos grupos não tratado ou tratado com solução fisiológica que no grupo que recebeu SH.

Sabe-se que a infusão de SH na PA atenua os distúrbios hemodinâmicos e a lesão sistêmica, além de diminuir as citocinas inflamatórias, prevenir a infecção pancreática, aumentando a sobrevida ¹³⁰. Os efeitos da SH no equilíbrio oxidativo, observados no presente trabalho através de diversos parâmetros, podem ser um mecanismo para redução da excessiva ativação pró-inflamatória na PA, protegendo o fígado, reduzindo a expressão e atividade de MMPs, inicialmente e durante as 24 horas de estudo.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

A solução hipertônica reduziu a agressão inicial causada pela indução de pancreatite aguda, diminuindo o estresse oxidativo no fígado e contribuindo para um balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias. Conseqüentemente, o tratamento com solução hipertônica reduziu a intensa demanda de remodelamento hepático durante a pancreatite aguda, contribuindo para a manutenção da integridade de matriz extracelular. O modelo experimental de pancreatite aguda não produziu mudanças significativas no perfil das proteínas relacionadas a apoptose estudadas, entretanto, a solução hipertônica mantém nos níveis basais a expressão das *Heat Shock Proteins* por proteger o fígado inicialmente.

Devido à importância do fígado como órgão-alvo da disfunção orgânica na pancreatite aguda, o efeito da solução hipertônica na lesão hepática pode ter uma relevância clínica. Nosso estudo contribui para dar suporte à relevância da solução hipertônica como alternativa terapêutica na prevenção da lesão hepática em doenças graves e, particularmente na pancreatite aguda.

Referências

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Folch-Puy E, Garcia-Movtero A, Iovanna JL, Dagorn JC, Prats N, Vaccaro MI, Closa D: The pancreatitis-associated protein induces lung inflammation in the rat through activation of TNF α expression in hepatocytes. *J Pathol* 2003, 199:398-408.
2. Cappell MS. Acute pancreatitis: etiology, clinical presentation, diagnosis, and therapy. *Med Clin North Am* 2008, 92:889-923.
3. Jha RK, Ma Q, Sha H, Palikhe M. Acute pancreatitis: a literature review. *Med Sci Monit.* 2009, 15(7): 147-56.
4. Corfield AP, Cooper MJ, Williamson RC, Mayer AD, McMahon MJ, Dickson AP, et al. Prediction of severity in acute pancreatitis: prospective comparison of three prognostic indices. *Lancet* 1985; 2:403-7.
5. Durgenier, T.L.; Reynaert M.; Laterre, P.F. Early multi-system organ failure associated with acute pancreatitis: a plea for a conservative therapeutic strategy. *Acta Gastroenterol Belg* 2003; 66:177-83.
6. Betarello A.; Mott, C.B. *Pancreatitis*. São Paulo: Sarvier, 1978.
7. Jaffray, C.; Yang, J.; Norman, J. Elastase mimics pancreatitis – induced hepatic injury via inflammatory mediators. *Elsevier* 2000, 2: 95-101.
8. Renner, I.G.; Savage, W.T.; Pantoja, J.L.; Renner, V.J. Death due to acute pancreatitis. A retrospective analysis of 405 autopsy cases. *Dig Dis Sci* 1985; 30:1005-18.
9. Tonsi AF, Bacchion M, Crippa S, Malleo G, Bassi C. Acute pancreatitis at the beginning of the 21st century: The state of the art. *World J Gastroenterol* 2009, 15(24):2945-2959.
10. Smith, M.E.; Morton, D.G. *O Sistema Digestivo: ciência básica e condições clínicas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
11. Saluja, A.K.; Bhagat, L.; Lee, H.S.; Bhatia, M.; Frossard, J.L.; Steer, M.L. Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury in rat pancreatic acini. *Am J Physiol* 1999; 276:G835-42.
12. Elfar M, Gaber LW, Sabek O, Fischer CP, Gaber AO. The inflammatory cascade in acute pancreatitis: relevance to clinical disease. *Surg Clin North Am* 2007; 87:1325-40.
13. Medzhitov, R.; J Aneway, C. Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343:338-44.
14. Hirano T, Manabe T, Tobe T: Impaired hepatic energy metabolism in rat acute pancreatitis: protective effects of prostaglandin E2 and synthetic protease inhibitor ONO 3307. *J Surg Res* 1992, 53:238-244.
15. Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1998; 175:76-83.

16. Song, A.M.; Bhagat, L.; Singh, V.P.; Van Acker, G.G.; Steer, M.L.; Saluja, A.K. Inhibition of cyclooxygenase-2 ameliorates the severity of pancreatitis and associated lung injury. *Am J Physiol, Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283:G1166-74.
17. Bielecki, J.W., Dlugosz, J., Pawlicka. E. & Gabryelewicz, A. The effect of pancreatitis associated ascitic fluid on some functions of rat liver mitochondria. *Int J Pancreatol* 1989, 5: 145-156.
18. Coticchia, J.M.; Lesser, M.A.; Carey, L.C.; Mayer, A.D. & Mc Mahin, M.G. Peritoneal fluid in acute pancreatitis blocks hepatic mitochondrial respiration. *Surgery* 1986, 100:850-856.
19. Murr, M.M.; Yang Z.; Fier, A.; Kaulor P.; Mastorides S.; Norman Z.G. Pancretatic Elastase Induces Liver Injury by Activating Cytokine Production Within Kupffer Cells via Nuclear Factor-Kappa B. *J Gastrointestinal Surgery* 2002; 6(3): 474-480.
20. Pappas, T.N., Lesser, M.A., Ellison, E.C. & Carey, L.C. Pancreatitis associated ascitic fluid: effect on oxygen consumption of liver cells. *Proc Soc Biol Med* 1982, 169: 438-444.
21. Anderson, MC. Hepatic Morphology and Function. *Arch Surg* 1966, 92:664-671.
22. Fisher, E.R.; Mccloy D. Hepatic Lesions of Acute Hemorrhagic Pancreatitis. *Surgery* 1955, 37: 213-219.
23. Gerber, M.A.; Thung, S.N. Histology of the Liver. *Am J Surg Pathol* 1987, 11(9): 709-722.
24. Dos Reis, L. Visceral Lesions in Acute Pancreatitis. *Archives of Surgery* 1963, 87: 604-608.
25. Guice, K.S.; Oldhan, K.T.; Caty, M.G.; Johnson, K.J. Neutrophil dependent, oxygen-radial mediated lung injury associated with pancreatitis. *Ann Surg* 1989; 210:740-7
26. Bhatia, M.; Brady, M.; Zagorski, J. et al. Treatment with neutralising antibody against cytokine induced neutrophil chemoattractant (CINC) protects rats against acute pancreatitis associated lung injury. *Gut* 2000; 47:838-44.
27. Coelho, A.M.; Machado, M.C.; Cunha, J.E.; Sampietre S.N.; Abdo E.E. Influence of pancreatitis enzyme content on experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 2003, 3:230-4.
28. Stevens T, Conwell DL, Zuccaro G. Pathogenesis of chronic pancreatitis: an evidence-based review of past theories and recent developments. *Am J Gastroenterol.* 2004, 99(11):2256-70
29. Dryden GW, Deaciuc I, Arteel G, and McClain CJ. Clinical implications of oxidative stress and antioxidant therapy. *Current gastroenterology reports* 2005, 7(4):308.
30. Coelho, AMM.; Machado MCC; Sampietre, SN; Abdo EE; Pinnotti, HW. Lesão Hepática na pancreatite aguda: estudo experimental em ratos. *GED* 1995, 14(2):59-64.
31. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, and Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2002; 65: 166-176.
32. Rai RM, Lee FY, Rosen A, Yang SQ, Lin HZ, Koteish A, Liew FY, Zaragoza C, Lowenstein C, Diehl AM: Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthase deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:13829-13834.

33. Vodovotz Y, Kim PK, Bagci EZ, Ermentrout GB, Chow CC, Bahar I, and Billiar TR: Inflammatory modulation of hepatocyte apoptosis by nitric oxide: in vivo, in vitro, and in silico studies. *Curr Mol Med* 2004, 4: 753-762.
34. Fang FC: *Nitric Oxide and Infection*. Edited by Fang FC. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 1999.
35. Batcioglu, K; Gul, M; Uyumlu, AB e Esrefoglu M. Liver lipid peroxidation and antioxidant capacity in cerulein-induced acute pancreatitis. *Braz J Med Biol Res* 2009, 42(9):776-782.
36. Leung PS, Chan YC. Role of Oxidative Stress in Pancreatic Inflammation. *Antioxidants & Redox Signaling* 2009, 11(1): 135-166.
37. DiMagno MJ, Hao Y, Tsunoda Y, Williams JA, Owyang C. Secretagogue-stimulated pancreatic secretion is differentially regulated by constitutive NOS isoforms in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, 286: G428-G436.
38. Werner J, del Castillo CF, Rivera JA, Kollias N, Lewandrowski KB, Rattner DW, Warshaw AL. On the protective mechanisms of nitric oxide in acute pancreatitis. *Gut* 1998; 43:401-407.
39. Chvanov M, Petersen OH Tepikin A. Free radicals and the pancreatic acinar cells: role in physiology and pathology. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2005, 360:2273–2284.
40. Flodström M, Horwitz MS, Maday A, Balakrishna D, Rodriguez E, Sarvetnick N. A Critical Role for Inducible Nitric Oxide Synthase in Host Survival Following Coxsackievirus B4 Infection. *Virology* 2001, 281(2):205-215.
41. Qui B, Mei QB, Ma JJ, Korsten MA. Susceptibility to Cerulein-Induced Pancreatitis in Inducible Nitric Oxide Synthase-Deficient Mice. *Pancreas* 2001, 23(1):89-93.
42. Takeyama, Y.; Hori, Y.H.; Takase, K.; Ueda, T.; Yamamoto, M.; Kuroda, Y. Apoptotic cell death of hepatocytes in rat experimental severe acute pancreatitis. *Surger*, 2000, 127:55-64.
43. Cooper GM, Hausman RE. *The Cell: A Molecular Approach*. 3^a. Ed. 2004 ASM Press, Washington, DC.
44. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev. Immunol* 2006, 6:813–822.
45. Robertson JD, Enoksson M, Suomela M, Zhivotovsky B, Orrenius S. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome *c* release during etoposide-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 2002, 277(33):29803–29809.
46. Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Caspase-2 Induces Apoptosis by Releasing Proapoptotic Proteins from Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 2002, 277(16):13430–13437.
47. Lin CH, Chen CL, Chang WT, Jan MS, Hsu LJ, Wu RH, Tang MJ, Chang WC, Lin YS. Sequential caspase-2 and caspase-8 activation upstream of mitochondria during ceramide- and etoposide-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 2004, 279(39):40755–40761.
48. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998, 281:1309–1312.

49. Sha H, Ma Q, Jha RK, Xu F, Wang L, Wang Z, Zhao Y, Fan F. Resveratrol ameliorates hepatic injury via the mitochondrial pathway in rats with severe acute pancreatitis. *European Journal of Pharmacology* 2008, 601: 136-142.
50. Criddle DN, Gerasimenko JV, Baumgartner HK, Jaffar M, Voronina S, Sutton R, Petersen OH, Gerasimenko OV. Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis?. *Cell Death Differ.* 2007, 14(7):1285-94.
51. Kaiser AM, Saluja AK, Sengupta A, Saluja M, Steer ML. Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol Cell Physiol* 1995, 269: C1295-C1304.
52. Bhatia M. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286:G189-96.
53. Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* 2003, 17: 2481–2495.
54. Bedossa P, and Paradis V: Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol* 2003; 200:504-515.
55. Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. *Semin Liver Dis* 1990, 10: 1-10.
56. Alvaro D, et al. Estrogen receptors in cholangiocytes and the progression of primary biliary cirrhosis. *Journal of Hepatology* 2004; 41:905–912.
57. Lechuga CG, Nazara ZH, Rosales JA, Morris ER, Rincon AR, Estilla AMR, Gamboa AE, Rojkind M. TGF- β 1 modulates matrix metalloproteinase-13 expression in hepatic stellate cells by complex mechanisms involving p38MAPK, PI3-kinase, AKT, and p70^{S6k}. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, 287:G974-G987.
58. Lotersyajn S, Julien B, Teixeira CF, Grenard P, Mallat A. Hepatic Fibrosis: Molecular Mechanisms and Drug Targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2004, 45:605-28.
59. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005,115(4):1100.
60. Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC. *Diseases of the Liver.* 8 ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1999, p. 477-490.
61. Jaeschke H. Redox Considerations in Hepatic Injury and Inflammation. *Antioxidants & Redox Signaling* 2002, 4(5): 699-700.
62. Alberts B, Bray D, Lewis J, Rass M, Roberts K, Watson J.D. *Molecular biology of the cell.* 3 ed. Garland Science Publishing, 1994.
63. Kleinman HK, Mcgarvey ML, Hassel JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, Martin GR. Basement membrane complexes with biological activities. *Biochemistry* 1986, v. 25, p. 312-318.
64. Ziober BL, Turner MA, Palefsky JM, Banda MJ, Kramer RH: Type I collagen degradation by invasive oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2000, 36:365-372.

65. Okamoto T, Akuta T, Tamura F, van Der Vliet A, and Akaike T: Molecular mechanism for activation and regulation of matrix metalloproteinases during bacterial infections and respiratory inflammation. *Biol Chem.* 2004; 385: 997-1006.
66. Sternlicht MD, Bergers G. Matrix metalloproteinases as emerging targets in anticancer therapy: status and prospects. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2000, 4(5): 609-633.
67. Keck T, Balcom JH, Dell-Castillo CF, Antoniu BA, Warshaw AL. Matrix Metalloproteinase-9 Promotes Neutrophil Migration and Alveolar Capillary Leakage in Pancreatitis-Associated Lung Injury in the Rat. *Gastroenterology* 2002, 122: 188-201.
68. Chen L, Wang X, Carter AS et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase 9 gene (-8202A/G) is associated with thoracic aortic aneurysms and thoracic aortic dissection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;131:1045-1052.
69. Muhs BE, Patel S, Yee H, Marcus S, Shamamian P. Increased matrix metalloproteinase expression and activation following experimental acute pancreatitis. *J Surg Res* 2001, 101:21-28.
70. Lee PP, Hwang JJ, Mead L, Ip MM. Functional role of matrix metalloproteinases (MMPs) in mammary epithelial cell development. *J Cell Physiol* 2001, 188:75-88.
71. Kähäri VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med.* 1999; 31(1):34-45.
72. Woessner J, Nagase H: *Matrix Metalloproteinases and TIMPs*. Oxford: Oxford University Press; 2000.
73. Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* 2001, 2:502-511.
74. Collier IE, Wihelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Selter JL et al. H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secretes a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 1988; 263: 6579-6587.
75. Murphy G, Reynolds JJ, Bretz U, Baggiolini M. Partial purification of collagenase and gelatinase from human polymorphonuclear leucocytes. Analysis of their actions on soluble and insoluble collagens. *Biochem. J.* 1982, 203: 209-221.
76. Shipley JM, Wesselschmidt RL, Kobayashi DK, Ley TJ, Shapiro SD. Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(9):3942-6.
77. Rooprai HK, Rucklidge GJ, Panou C, Pilkington GJ: The effects of exogenous growth factors on matrix metalloproteinase secretion by human brain tumour cells. *Br J Cancer* 2000, 82:52-55.
78. Pucci-Minafra I, Minafra S, La Rocca G, Barranca M, Fontana S, Alaimo G, Okada Y: Zymographic analysis of circulating and tissue forms of colon carcinoma gelatinase A (MMP-2) and B (MMP-9) separated by mono- and two-dimensional electrophoresis. *Matrix Biol* 2001, 20:419-427.
79. Williams TN, Zhang CX, Game BA, He L, Huang Y. C-Reactive Protein Stimulates MMP-1 Expression in U937 Histiocytes Through Fc γ RII and Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway:

An Implication of CRP Involvement in Plaque Destabilization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004, 24:61.

80. Saluja A, Dudeja V. Heat shock proteins in pancreatic diseases. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008, 23 (1):S42-5.

81. Rakonczay Z, Jr., Takacs T, Boros I, Lonovics J: Heat shock proteins and the pancreas. *J Cell Physiol* 2003, 195:383-391.

82. Bhagat L, Singh VP, Hietaranta AJ, Agrawal S, Steer ML, Saluja AK: Heat shock protein 70 prevents secretagogue-induced cell injury in the pancreas by preventing intracellular trypsinogen activation. *J Clin Invest* 2000, 106:81-89.

83. Weber H, Wagner AC, Jonas L, Merkord J, Hofken T, Nizze H, Leitzmann P, Goke B, Schuff-Werner P: Heat shock response is associated with protection against acute interstitial pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 2000, 45:2252-2264.

84. Moretti AI, Rios EC, Soriano FG, de Souza HP, Abatepaulo F, Barbeiro DF, Velasco IT. Acute pancreatitis: hypertonic saline increases heat shock proteins 70 and 90 and reduces neutrophil infiltration in lung injury. *Pancreas* 2009; 38(5):507-14.

85. Lee HS, Bhagat L, Frossard JL, Hietaranta A, Singh VP, Steer ML, Saluja AK. Water immersion stress induces heat shock protein 60 expression and protects against pancreatitis in rats. *Gastroenterology*. 2000; 119(1):220-9.

86. Dudeja V, Vickers SM, Saluja AK. The role of heat shock proteins in gastrointestinal diseases. *Gut*. 2009; 58(7):1000-9.

87. Nagata K. Hsp47: a collagen-specific molecular chaperone. *Trends Biochem Sci*. 1996; 21(1):22-6.

88. Nagata K. Expression and function of heat shock protein 47: a collagen-specific molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *Matrix Biol*. 1998; 16(7):379-86.

89. Kawada N, Kuroki T, Kobayashi K, Inoue M, Nakatani K, Kaneda K, Nagata K. Expression of heat-shock protein 47 in mouse liver. *Cell Tissue Res*. 1996; 284(2):341-6.

90. Zhang XP, Chen L, Hu QF, Tian H, Xu RJ, Wang ZW, Wang KY, Cheng QH, Yan W, Li Y, Li QY, He Q, Wang F. Effects of large dose of dexamethasone on inflammatory mediators and pancreatic cell apoptosis of rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2007; 13(41):5506-11.

91. Cuthbertson CM, Christophi C. Disturbances of the microcirculation in acute pancreatitis. *Br J Surg*. 2006; 93(5):518-30.

92. Uhlmann D, Ludwig S, Geissler F, Tannapfel A, Hauss J, Witzigmann H. Importance of microcirculatory disturbances in the pathogenesis of pancreatitis. *Zentralbl Chir*. 2001; 126(11):873-8.

93. Arita T, Matsunaga N, Takano K, Hara A, Fujita T, Honjo K. Hepatic perfusion abnormalities in acute pancreatitis: CT appearance and clinical importance. *Abdom Imaging*. 1999; 24(2):157-62.
94. Tutcu S, Serter S, Kaya Y, Kara E, Neşe N, Pekindil G, Coşkun T. Hepatic perfusion changes in an experimental model of acute pancreatitis: Evaluation by perfusion CT. *Eur J Radiol*. 2009, 5 (Epub ahead of print).
95. Jha RK, Ma Q, Sha H, Palikhe M. Acute pancreatitis: a literature review. *Med Sci Monit*. 2009; 15(7):RA147-56.
96. Foitzik T, Faulhaber J, Hotz HG, Kirchengast M, Buhr HJ. Endothelin receptor blockade improves fluid sequestration, pancreatic capillary blood flow, and survival in severe experimental pancreatitis. *Ann Surg*. 1998; 228(5):670-5.
97. Dobosz M, Hac S, Mionskowska L, Dobrowolski S, Wajda Z. Microcirculatory disturbances of the pancreas in cerulein-induced acute pancreatitis in rats with reference to L-arginine, heparin, and procaine treatment. *Pharmacol Res*. 1997; 36(2):123-8.
98. DiMagno MJ, Williams JA, Hao Y, Ernst SA, Owyang C. Endothelial nitric oxide synthase is protective in the initiation of caerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004; 287(1):G80-7.
99. Zhu W, Li J, Tu W, Li N. Effects of platelet activating factor antagonist (BN50739) on gut mucosal injury in acute severe pancreatitis in pigs. *Chin Med J (Engl)*. 2000; 113(8):756-8.
100. Foitzik T, Eibl G, Buhr HJ. Therapy for microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: comparison of delayed therapy with ICAM-1 antibodies and a specific endothelin A receptor antagonist. *J Gastrointest Surg*. 2000; 4(3):240-6.
101. Velasco IT, Pontieri V, Rocha e Silva M, Jr., Lopes OU: Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 1980; 239:H664-673.
102. Siritongtaworn P, Moore EE, Marx JA, Van Lighten P, Ammons LA, Bar-Or D. The benefits of 7.5% NaCl/6% dextran 70 (HSD) for prehospital resuscitation of hemorrhagic shock: improved oxygen transport. *Braz J Med Biol Res*. 1989; 22(2):275-8.
103. Kreimeier U, Brueckner UB, Schmidt J, Messmer K. Instantaneous restoration of regional organ blood flow after severe hemorrhage: effect of small-volume resuscitation with hypertonic-hyperoncotic solutions. *J Surg Res*. 1990; 49(6):493-503.
104. Mazzoni MC, Borgstrom P, Arfors KE, Intaglietta M. The efficacy of iso- and hyperosmotic fluids as volume expanders in fixed-volume and uncontrolled hemorrhage. *Ann Emerg Med*. 1990; 19(4):350-8.
105. Bauer M, Marzi I, Ziegenfuss T, Seeck G, Bühren V, Larsen R. Comparative effects of crystalloid and small volume hypertonic hyperoncotic fluid resuscitation on hepatic microcirculation after hemorrhagic shock. *Circ Shock*. 1993; 40(3):187-93.

106. Zallen G, Moore EE, Tamura DY, Johnson JL, Biffl WL, Silliman CC. Hypertonic saline resuscitation abrogates neutrophil priming by mesenteric lymph. *J Trauma* 2000; 48:45-8.
107. Powers KA, Zurawska J, Szaszi K, Khadaroo RG, Kapus A, and Rotstein OD: Hypertonic resuscitation of hemorrhagic shock prevents alveolar macrophage activation by preventing systemic oxidative stress due to gut ischemia/reperfusion. *Surgery* 2005; 137:66-74.
108. Thiel M, Buessecker F, Eberhardt K, Chouker A, Setzer F, Kreimeier U, Arfors KE, Peter K, and Messmer K: Effects of hypertonic saline on expression of human polymorphonuclear leukocyte adhesion molecules. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 261-273.
109. Fernandes TR, Pontieri V, Moretti AI, Teixeira DO, Abatepaulo F, Soriano FG, Negri EM, Velasco IT, and Souza HP: Hypertonic saline solution increases the expression of heat shock protein 70 and improves lung inflammation early after reperfusion in a rodent model of controlled hemorrhage. *Shock* 2007; 27: 172-178.
110. Gurfinkel V, Poggetti RS, Fontes B, da Costa Ferreira Novo F, and Birolini D: Hypertonic saline improves tissue oxygenation and reduces systemic and pulmonary inflammatory response caused by hemorrhagic shock. *J Trauma* 2003; 54: 1137-1145.
111. Ciesla DJ, Moore EE, Biffl WL, Gonzalez RJ, Moore HB, and Silliman CC: Hypertonic saline activation of p38 MAPK primes the PMN respiratory burst. *Shock* 2001; 16: 285-289.
112. Rizoli SB, Kapus A, Fan J, Li YH, Marshall JC, and Rotstein OD: Immunomodulatory effects of hypertonic resuscitation on the development of lung inflammation following hemorrhagic shock. *J Immunol* 1998; 161: 6288-6296.
113. Junger WG, Coimbra R, Liu FC, Herdon-Remelius C, Junger W, Junger H, Loomis W, Hoyt DB, and Altman A: Hypertonic saline resuscitation: a tool to modulate immune function in trauma patients? *Shock* 1997; 8: 235-241.
114. Oliveira RP, Velasco I, Soriano F, and Friedman G: Clinical review: Hypertonic saline resuscitation in sepsis. *Crit Care* 2002; 6: 418-423.
115. Folch E, Salas A, Panes J, Gelpi E, Rosello-Catafau J, Anderson DC, Navarro S, Pique JM, Fernandez-Cruz L, and Closa D: Role of P-selectin and ICAM-1 in pancreatitis-induced lung inflammation in rats: significance of oxidative stress. *Ann Surg.* 1999; 230:792-798.
116. Horton JW, Dunn CW, Burnweit CA, and Walker PB: Hypertonic saline-dextran resuscitation of acute canine bile-induced pancreatitis. *Am J Surg* 1989; 158: 48-41.
117. Schmidt J, Huch K, Mithofer K, Hotz HG, Sinn HP, Buhr HJ, Warshaw AL, Herfarth C, and Klar E: Benefits of various dextrans after delayed therapy in necrotizing pancreatitis of the rat. *Intensive Care Med* 1996; 22: 1207-1213.
118. Kondo Y, Nagai H, Kasahara K, and Kanazawa K: The therapeutic effect of hypertonic solutions on the changes in the effective circulating plasma volume in acute necrotizing pancreatitis in rats. *Surg Today* 1998; 28: 1247-1253.

119. Shields CJ, Winter DC, Sookhai S, Ryan L, Kirwan WO, and Redmond HP: Hypertonic saline attenuates end-organ damage in an experimental model of acute pancreatitis. *Br J Surg* 2000; 87:1336-1340.
120. Murao Y, Hata M, Ohnishi K, Okuchi K, Nakajima Y, Hiasa Y, Junger WG, Hoyt DB, Ohnishi T. Hypertonic saline resuscitation reduces apoptosis and tissue damage of the small intestine in a mouse model of hemorrhagic shock. *Shock*. 2003; 20(1):23-8.
121. Oreopoulos GD, Hamilton J, Rizoli SB, et al. In vivo and in vitro modulation of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression by hypertonicity. *Shock* 2000; 14:409-14.
122. Pascual JL, Ferri LE, Seely AJE, Campisi G, Chaudhury P, Giannias B, Evans DC, Razek T, Michel RP, Christou NV. Hypertonic Saline Resuscitation of Hemorrhagic Shock Diminishes Neutrophil Rolling and Adherence to Endothelium and Reduces In Vivo Vascular Leakage. *Annals of Surgery* 2002, 236(5):634-642.
123. Junger WG, Liu FC, Loomis WH, Hoyt DB. Hypertonic saline enhances cellular immune function. *Circ Shock*. 1994, 42(4):190-6.
124. Coimbra R, Junger WG, Liu FC, Loomis WH, Hoyt DB. Hypertonic/hyperoncotic fluids reverse prostaglandin E2 (PGE2)-induced T-cell suppression. *Shock* 1995, 4(1):45-9.
125. Ciesla DJ, Moore EE, Musters RJ, Biffl WL, Silliman CA. Hypertonic saline alteration of the PMN cytoskeleton: implications for signal transduction and the cytotoxic response. *J Trauma* 2001, 50(2):206-12.
126. Oreopoulos GD, Bradwell S, Lu Z, Fan J, Khadaroo R, Marshall JC, Li YH, Rotstein OD. Synergistic induction of IL-10 by hypertonic saline solution and lipopolysaccharides in murine peritoneal macrophages. *Surgery* 2001; 130(2):157-65.
127. Horton JW, Maass DL, White J, Sanders B. Hypertonic saline-dextran suppresses burn-related cytokine secretion by cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001, 280(4):H1591-601.
128. Horton JW, Maass DL, White DJ. Hypertonic saline dextran after burn injury decreases inflammatory cytokine responses to subsequent pneumonia-related sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290(4):H1642-50.
129. Diener JRC, da Rosa CM, Lins S. Acute Pancreatitis: An Update. *RBTI* 2004, 16(4):261-265.
130. Machado MC, Coelho AM, Pontieri V, Sampietre SN, Molan NA, Soriano F, Matheus AS, Patzina RA, Cunha JE, and Velasco IT: Local and systemic effects of hypertonic solution (NaCl 7.5%) in experimental acute pancreatitis. *Pancreas*. 2006; 32: 80-86.
131. Li J, Billiar TR. The anti-apoptotic actions of nitric oxide in hepatocytes. *Cell Death Differ*. 1999, 6(10):952-5.
132. Zheng TS, Flavell RA. Divinations and surprises: genetic analysis of caspase function in mice. *Exp. Cell Res*. 2000, 256: 67-73.

133. Matikainen T, Perez GI, Zheng TS, Kluzak TR, Rueda BR, Flavell RA, Tilly JL. Caspase-3 gene knockout defines cell lineage specificity for programmed cell death signaling in the ovary. *Endocrinology* 2001, 142: 2468–2480.
134. Droin N, Dubrez L, Eymin B, Renvoize C, Breard J, Dimanche-Boitrel MT, Solary E. Up-regulation of CASP genes in human tumor cells undergoing etoposide- induced apoptosis. *Oncogene* 1998, 16: 2885–2894.
135. Chen T, Yang I, Irby R, Shain KH, Wang HG, Quackenbush J, Coppola D, Cheng JQ, Yeatman TJ. Regulation of caspase expression and apoptosis by adenomatous polyposis coli. *Cancer Research* 2003; 63(1): 4368–4374.
136. Li J., Billiar T. R., Talanian R. V., Kim Y. M. Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 240: 419-424.
137. Kossakowska AE, Edwards DR, Lee SS, Urbanski LS, Stabbler AL, Zhang CL, Phillips BW, Zhang Y, and Urbanski SJ: Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis. *Am J Pathol* 1998; 153:1895-1902.
138. Kone BC, Kunczewicz, T, Zhang W, Yu ZY. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285:F178-F190.
139. Felley-Bosco E, Bender FC, Courjault-Gaurier F, Bron C, and Quest AF. Caveolin-1 down-regulates inducible nitric oxide synthase via the proteasoma pathway in human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:14334-14339.
140. McNaughton L, Puttagunta L, Martinez-Cuesta MA, Kneteman N, Mayers I, Moqbel R, Hamid Q, Radomski MW. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *Proc Natl Acad Sci* 2002, 24; 99(26):17161-6.
141. Radomski A, Sawicki G, Olson DM, Radomski MW. The role of nitric oxide and metalloproteinases in the pathogenesis of hypoxia-induced lung injury in newborn rats. *Br J Pharmacol.* 1998; 125(7):1455-62.
142. Chang YS, Lo CW, Sun FC, Chang MD, Lai YK. Differential expression of Hsp90 isoforms in geldanamycin-treated 9L cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 344(1):37-44.
143. Boo YC, Hwang J, Sykes M, Michell BJ, Kemp BE, Lum H, Jo H. Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283(5):H1819-28.
144. Varga IS, Matkovics B, Czako L, Hai DQ, Kotorman M, Takacs T, and Sasvari M: Oxidative stress changes in L-arginine-induced pancreatitis in rats. *Pancreas* 1997; 14: 355-359.
145. Varga IS, Matkovics B, Hai DQ, Kotorman M, Takacs T, and Sasvari M: Lipid peroxidation and antioxidant system changes in acute L-arginine pancreatitis in rats. *Acta Physiol Hung* 85: 129-138, 1997.

146. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 1998, 25(4-5):434-56.
147. Pacher P, Beckman JS, and Liaudet L: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87: 315-424.
148. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai JM, Martin JC, Smith CD, et al. Peroxynitrite mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298:431-7.
149. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with NMDA or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92:7162-6.
150. Yamaguchi Y, Okabe K, Matsumoto F, Akizuki E, Matsuda T, Ohshiro H, et al. Peroxynitrite formation during rat hepatic allograft rejection. *Hepatology* 1999; 29:777-84.
151. Kooy NW, Royall JA, Ye YZ, Kelly DR, Beckman JS. Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:1250-4.
152. Kohn G, Wong HR, Bshesh K, et al. Heat shock inhibits tnf-induced ICAM-1 expression in human endothelial cells via I kappa kinase inhibition. *Shock* 2002; 17(2):91Y97.
153. Strowski MZ, Sparmann G, Weber H, Fiedler F, Printz H, Jonas L, Göke B, Wagner AC. Caerulein pancreatitis increases mRNA but reduces protein levels of rat pancreatic heat shock proteins. *Am J Physiol.* 1997; 273:G937-45.
154. Ohashi K, Burkart V, Flohé S, et al. Cutting edge: Heat Shock Protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll-Like Receptor-4 complex. *J Immunol* 2000; 164:558-61.
155. Cumming DV, Heads RJ, Watson A, Latchman DS, Yellon DM. Differential protection of primary rat cardiocytes by transfection of specific heat stress proteins. *J Mol Cell Cardiol.* 1996; 28(12):2343-9.
156. Yilmaz N, Dulger H, Kiyamaz N, Yilmaz C, Gudu BO, Demir I. Activity of mannitol and hypertonic saline therapy on the oxidant and antioxidant system during the acute term after traumatic brain injury in the rats. *Brain Res.* 2007 20;1164:132-5.
157. Deree J, Martins JO, Leedom A, Lamon B, Putnam J, de Campos T, Hoyt DB, Wolf P, Coimbra R. Hypertonic saline and pentoxifylline reduces hemorrhagic shock resuscitation-induced pulmonary inflammation through attenuation of neutrophil degranulation and proinflammatory mediator synthesis. *J Trauma.* 2007; 62(1):104-11.
158. Urtasun R, Conde de la Rosa L, Nieto N. Oxidative and nitrosative stress and fibrogenic response. *Clin Liver Dis.* 2008; 12(4):769-90.
159. Arthur MJ: Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *AmJ Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279:245-249.
160. Tasab M, Batten MR, Bulleid NJ. Hsp47: a molecular chaperone that interacts with and stabilizes correctly-folded procollagen. *EMBO J.* 2000; 19(10):2204-11.

Anexo

HYPERTONIC SALINE REDUCES METALLOPROTEINASE EXPRESSION IN LIVER DURING PANCREATITIS

Ester CS Rios, Ana IS Moretti, Heraldo P de Souza, Irineu T Velasco and Francisco G Soriano

Laboratory of Medical Investigation (LIM-51) and Department of Emergency Medicine, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

SUMMARY

1. We recently demonstrated that hypertonic saline reduces inflammation and mortality in acute pancreatitis. The present study investigated the effects of hypertonic saline in metalloproteinase (MMP) regulation and pancreatitis-associated hepatic injury.

2. Wistar rats were divided into four groups: (i) control, not subjected to insult or treatment; (ii) no treatment (NT), induction of pancreatitis (retrograde infusion of 2.5% sodium taurocholate (1.0 mL/kg)), but no further treatment; (iii) normal saline (NS), induction of pancreatitis and treatment with normal saline (0.9% NaCl, 34 mL/kg, i.v. bolus, 1 h after the induction of pancreatitis); and (iv) hypertonic saline (HS), induction of pancreatitis and treatment with hypertonic saline (7.5% NaCl, 4 mL/kg administered over a period of 5 min, 1 h after the induction of pancreatitis). In all four groups, 4, 12 and 24 h after the induction of pancreatitis, liver tissue samples were assayed to determine levels of MMP-2, MMP-9, 47 kDa heat shock protein (HSP47) and collagen (Type I and III).

3. Compared with the control group, MMP-9 expression and activity was increased twofold in the NS and NT groups 4 and 12 h after the induction of pancreatitis, but remained at basal levels in the HS group. In contrast, MMP-2 expression was increased twofold 12 h after the induction of pancreatitis only in the NS group, whereas the expression of HSP47 was increased 4 h after the induction of pancreatitis in the NS and NT groups. Greater extracellular matrix remodelling occurred in the NS and NT groups compared with the HS group, probably as a result of the hepatic wound-healing response to repeated injury. However, the collagen content in hepatic tissue remained at basal levels in the HS group.

4. In conclusion, the results of the present study indicate that hypertonic saline is hepatoprotective and reduces hepatic remodelling, maintaining the integrity of the hepatic extracellular matrix during pancreatitis. Hypertonic saline-mediated regulation of MMP expression may have clinical relevance in pancreatitis-associated liver injury.

Key words: extracellular matrix, hypertonic saline solution, liver/injuries, pancreatitis.

INTRODUCTION

The most serious complications in severe acute pancreatitis are the systemic inflammatory response and subsequent multiple organ failure, which continue to be the main contributing factors to the high mortality rate.^{1–3} The systemic inflammatory response induces neutrophil accumulation in distant organs by the simultaneous activation of various pro-inflammatory pathways, including those regulating free radical generation, cytokine synthesis and complement activation, as well as those regulating the activity of proteolytic enzymes, such as matrix metalloproteinases (MMPs).^{4,5} The liver is a source of systemic pro-inflammatory mediators in acute pancreatitis^{1,6–8} and liver function determines the clinical evolution of the complications arising in patients with pancreatitis. Pancreatitis is strongly correlated with liver injury and it has recently been suggested that modulation of MMP activity is an efficient tool for achieving liver injury regression.⁹

Metalloproteinases are enzymes with different specificities for substrates of extracellular matrix (ECM).¹⁰ They are synthesized by a variety of cells in a zymogen form and can be activated by either proteolytic cleavage or oxidative stress.^{11,12} It is known that MMP-2 and MMP-9 play a major role in the digestion of basement membrane-like material and both are considered important mediators of inflammatory responses.¹³ Acting as regulatory molecules, MMP-2 and MMP-9 are functionally active in enzyme cascades, as well as in the processing of matrix proteins, cytokines, growth factors and adhesion molecules, thereby generating fragments with biological effects.¹⁴ In addition, the MMPs are involved in the early stages of fibrogenesis, because destruction of the low-density basement membrane-like material in the perisinusoidal space of the normal liver is a prerequisite for fibrillar matrix development.⁹

Changes in the ECM have a direct effect on liver function.⁹ In the acute phases of liver injury, there is increased expression of MMP-mediated degradation of fibrillar collagens.¹⁵ The 47 kDa heat shock protein (HSP47) interacts transiently with procollagen during its folding, assembly and transport from the endoplasmic reticulum.¹⁶ The heat shock proteins (HSPs) are also involved in the inflammatory process and have cytoprotective effects.^{17,18}

Since 1980, when Velasco *et al.*¹⁹ first observed the beneficial effects of using hypertonic saline as a resuscitation fluid (in dogs with haemorrhagic shock), various authors have investigated those effects. Different studies have shown that hypertonicity affects the immune system by activating gene expression,²⁰ regulating protein expression,^{21,22} activating kinases involved in intracellular signalling cascades^{23,24}

Correspondence: Francisco Garcia Soriano, Faculdade de Medicina da USP, LIM-51, Av. Dr Arnaldo, 455, 3º andar, sala 3189, Cerqueira César, 01246-903 São Paulo-SP, Brazil. Email: gsoriano@usp.br

Received 10 December 2008; revision 15 May 2009; accepted 18 May 2009.

© 2009 The Authors

Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Asia Pty Ltd

and promoting cell adhesion,²⁵ as well as by regulating the release of free radicals and cytokines.²³ Due to these effects, there is considerable interest in the use of hypertonic saline as an anti-inflammatory agent for the treatment of septic shock, trauma, haemorrhagic shock and organ dysfunction.^{26,27} In experimental pancreatitis, hypertonic saline has been reported to limit local and end-organ injury by altering the circulating plasma volume, decreasing trypsinogen activation, preventing acinar necrosis, reducing inflammatory cytokine levels and preventing pancreatic infection, thereby reducing mortality.^{2,28–31}

Hypertonic saline can also influence the transcription, function and protein expression of MMPs, which are thought to play an essential role in tissue repair, cell death and morphogenesis.³² Based on these observations, the aim of the present study was to elucidate the effect of hypertonic saline resuscitation in pancreatitis-associated liver injury by evaluating the regulation of MMPs that are thought to play an important role in pathways activated by hypertonic saline.

METHODS

Induction of pancreatitis

All experiments were conducted in accordance with guidelines established by the Research Ethics Committee of the University of Sao Paulo School of Medicine. Male Wistar rats, weighing 270–320 g, were anaesthetized by subcutaneous injections of ketamine (10 mg/kg) and xylazine (8 mg/kg). Acute pancreatitis was induced by retrograde infusion of 2.5% sodium taurocholate (1.0 mL/kg; Sigma, St Louis, MO, USA) into the pancreatic duct transduodenally via a 24 gauge angiocatheter at a constant infusion rate of 1 mL/min. The bile duct was clamped with a microsurgical 'bull-dog' clamp at the hepatic hilum to prevent leakage of taurocholate solution into the duodenum or its reflux into the liver. The hepatic hilar clamp was released after injection. Experiments were performed on four groups of rats: (i) a control group of rats in which pancreatitis was not induced and that did not receive any form of treatment; (ii) the no treatment (NT) group, in which pancreatitis was induced, but the rats received no other treatment; (iii) the normal saline (NS) group, in which pancreatitis was induced and rats received an intravenous bolus injection of normal saline (0.9% NaCl, 34 mL/kg) 1 h after the induction of pancreatitis; and (iv) the hypertonic saline (HS) group, in which pancreatitis was induced and hypertonic saline (7.5% NaCl, 4 mL/kg) was administered via the internal jugular vein, over a period of 5 min, 1 h after the induction of pancreatitis. The volume of normal saline infused was equivalent in sodium content to 4 mL/kg hypertonic saline. Rats were killed and the livers collected 4, 12, or 24 h after the induction of pancreatitis.

Preparation of liver tissue samples

Frozen tissue samples (100 mg) were pulverized in liquid nitrogen. Samples were then homogenized in Triton X-100 buffer containing 1% Triton X-100, 20 mmol/L Tris (pH 8.0), 10% glycerol, 135 mmol/L NaCl and proteolytic enzyme inhibitors (40 µg/mL phenylmethylsulphonyl fluoride and 10 µg/mL pepstatin; Sigma). After separation of debris by centrifugation for 45 min at 14 000 g, the supernatants were reserved and protein concentration was determined by the Bradford method (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Samples were stored at –80°C until assay.

Zymography

Supernatants from tissue preparations were diluted to a protein concentration of 1 mg/mL. Aliquots (20 µL) were applied to 10% polyacrylamide gels with 1% gelatin incorporated as a substrate for gelatinolytic proteases. After the gel had been run, the sodium dodecyl sulphate (SDS) was removed by washing the gel twice in 2.5% (v/v) Triton X-100 for 30 min. The gel was incubated for 3 days in zymography development buffer containing 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 2 mmol/L Na₂S₂O₈ and 5 mmol/L CaCl₂. After

development, the gels were stained for 3 h in 45% methanol and 10% glacial acetic acid containing 1% (w/v) Coomassie Blue R-250 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), after which gels were partially destained in the same solution without dye. The gelatinolytic activity of each MMP was evaluated qualitatively as a clear band against the blue-stained gel background. The band intensity of the original blots was quantified using Image J software (Research Services Branch, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and normalized against control levels (control = 1).

Immunoblotting

Protein expression was determined via SDS–polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions. Liver tissue extracts (25–100 µg/mL) were boiled in equal volumes of loading buffer (150 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 15% β-mercaptoethanol and 0.01% bromophenol blue) and subjected to electrophoresis on 10% polyacrylamide gels. Following electrophoretic separation, proteins were transferred to Hybond-P membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline and 0.5% Tween 20 (TBST) for 1 h. The following primary antibodies were used: rabbit polyclonal anti-MMP-2 (1 : 1000; sc10736; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); rabbit polyclonal anti-MMP-9 (1 : 1000; sc6840; Santa Cruz Biotechnology); goat polyclonal anti-Type I collagen (1 : 1000; sc8784; Santa Cruz Biotechnology); rabbit polyclonal anti-Type III collagen (1 : 1000; sc8780-R; Santa Cruz Biotechnology); rabbit polyclonal anti-HSP47 (1 : 1000; sc8352; Santa Cruz Biotechnology); and mouse anti-β-actin (1 : 10 000; A5441; Sigma). All antibodies were incubated at 4°C overnight. After blots had been washed twice with TBST, the horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit polyclonal sc2004 or rabbit anti-goat sc2768; Santa Cruz Biotechnology) was applied at a dilution of 1 : 1000 for 2 h. Blots were washed in TBST twice over 30 min, incubated using an enhanced SuperSignal chemiluminescent reagent detection kit (Pierce, Rockford, IL, USA) and exposed to Kodak O-MAT-AR photographic film (Kodak, Rochester, NY, USA). The band intensity of the original blots was quantified using Image J software and normalized against controls (control = 1).

Statistical analysis

All values are expressed as the mean ± SEM. Analyses were performed using Sigma Stat Statistical Software, version 3.1 (Sigma Stat Software, Chicago, IL, USA). Comparisons among experimental groups were performed by analysis of variance and a post hoc Tukey test was used to compare individual groups. $P < 0.05$ was considered significant. Correlations between the expression of HSP47 and MMP-9 were determined by simple linear regression analysis.

RESULTS

Metalloproteinases

It is known that MMP-2 and MMP-9 are normally produced in liver tissue, where their pro-enzyme and active forms can both be detected. As shown in Fig. 1a, the expression of MMP-9 was significantly higher in the NS group than in the control group at 4 ($P < 0.01$) and 12 h ($P < 0.05$) after the induction of pancreatitis. The same was found for MMP-9 activity in the NS and NT groups ($P < 0.05$ vs controls; Fig. 1b). However, this increase was completely blocked in the HS group 4 and 12 h after the induction of pancreatitis ($P < 0.05$ vs NT and NS groups), as well as at 24 h ($P < 0.05$ vs NS). Levels of MMP-9 and MMP-2 gene transcription were not altered in any of the groups studied (data not shown).

An increase in the expression of MMP-2 in the NS group was observed 12 h after the induction of pancreatitis ($P < 0.01$ vs controls; Fig. 2a). At this time, MMP-2 activity was lower in the NT and NS

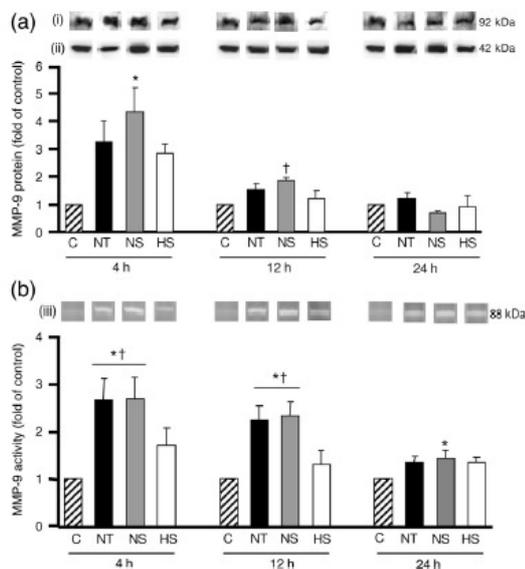


Fig. 1 Effect of hypertonic saline on hepatic matrix metalloproteinase (MMP)-9 protein expression (a) and activity (b). Pancreatitis was induced by retrograde infusion of 2.5% sodium taurocholate and rats were killed after 4, 12 or 24 h. C, control; NT, pancreatitis without treatment; NS, pancreatitis with normal saline treatment; HS, pancreatitis with hypertonic saline treatment. (i) Representative western blot of MMP-9 protein expression; (ii) 88 kDa band, the active form of MMP-9, in gelatin zymography; (iii) β -actin was used as a loading control (100 μ g protein/lane). Data are the mean \pm SEM ($n = 4$ (a) and 8 (b) rats per group). * $P < 0.05$ compared with control; † $P < 0.001$ compared with HS. The densitometry of the original blot was assessed using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

groups than in the control group ($P < 0.01$). As can be seen in Fig. 2b, the pancreatitis groups exhibited significant decreases in MMP-2 activity 12 h after the induction of pancreatitis compared with control ($P < 0.01$), although MMP-2 activity had normalized by 24 h in the HS group.

The 47-kDa heat shock protein

In order to study the remodelling process, we investigated the expression of HSP47, which seems to be closely associated with collagen metabolism, in which the MMPs are involved.

The control group exhibited low constitutive expression of HSP47 (Fig. 3a). By 4 h after the induction of pancreatitis, HSP47 levels had increased in the NT and NS groups ($P < 0.001$ vs control), whereas HSP47 expression remained at basal levels in the HS group ($P < 0.05$ vs NS and NT). At 24 h after the induction of pancreatitis, the NT group continued to exhibit elevated HSP47 expression ($P < 0.05$ vs NS; $P < 0.01$ vs HS). Figure 3b shows the correlation between the expression of HSP47 and MMP-9 ($R = 0.825$; $P < 0.001$; $n = 30$).

Type I and Type III collagen

In view of the role that MMP activity plays in ECM modulation and HSP47 expression, we investigated whether treatment with hypertonic

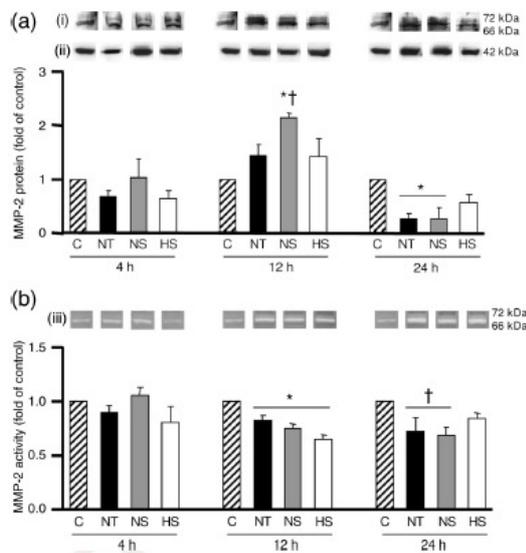


Fig. 2 Matrix metalloproteinase (MMP)-2 protein expression (a) and activity (b) in the liver 4, 12 and 24 h after the induction of pancreatitis. C, control; NT, pancreatitis without treatment; NS, pancreatitis with normal saline treatment; HS, pancreatitis with hypertonic saline treatment. (i) Representative western blot of MMP-2 protein expression; (ii) β -actin was used as the loading control (100 μ g protein/lane); (iii) active forms of MMP-2 were identified in gelatin zymography (66 kDa band = active MMP-2; 72 kDa band = latent MMP-2). Data are the mean \pm SEM ($n = 4$ (a) and 7 (b) rats per group). * $P < 0.01$ compared with control; † $P < 0.05$ compared with NT at 12 h. The densitometry of the original blot was assessed using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

saline could also regulate total collagen content in the liver. Basal expression of Type I and Type III collagen was determined in the liver (Fig. 4a). There were no differences between the HS and control groups in terms of the amount of collagen. However, 4 h after the induction of pancreatitis, there was a decrease in Type III collagen in the NS and NT groups ($P < 0.05$ vs control; Fig. 4b). At 24 h after the induction of pancreatitis, we observed an increase in Type I collagen was observed in the NS group ($P < 0.05$ vs control; Fig. 4a).

DISCUSSION

As an inflammatory disease with variable involvement of peripancreatic tissues and remote organ systems, acute pancreatitis continues to be a challenging clinical problem.³³ Many authors have described local changes during pancreatitis. Therefore, in the present study, we investigated distant changes in the liver.

Systemic inflammation triggered by acute pancreatitis involves multiple pathways and cannot be explained by the action of a single mediator. Oxidative stress and lipid peroxidation may constitute one of the common pathways leading to early activation of hepatic stellate cells after liver injury.² This would, in turn, lead to changes in the ECM components, involving degradation and fibrogenesis.⁹ In the extracellular space, degradation occurs predominantly as a consequence of the action of MMPs.¹⁵ In addition, many studies have shown that MMPs contribute to the development of the inflammatory

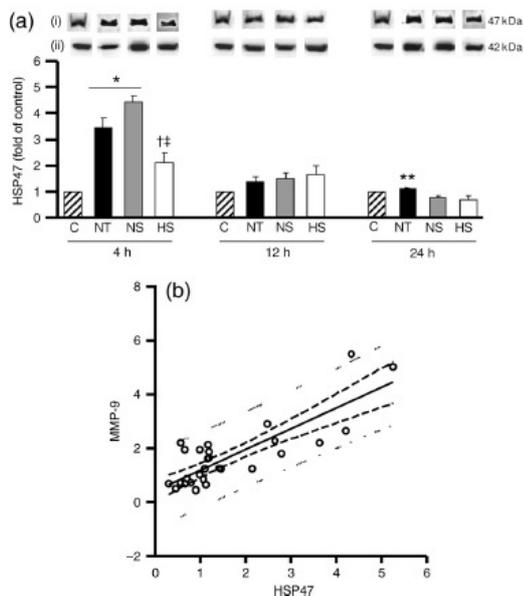


Fig. 3 (a) Heat shock protein (HSP) 47 expression in liver homogenates. Pancreatitis was induced by retrograde infusion of 2.5% sodium taurocholate and rats were killed after 4, 12 or 24 h. C, control; NT, pancreatitis without treatment; NS, pancreatitis with normal saline treatment; HS, pancreatitis with hypertonic saline treatment. (i) Representative western blot of HSP47 protein expression; (ii) β -actin was used as the loading control (100 μ g protein/lane). Data are the mean \pm SEM ($n = 5$). * $P < 0.001$ compared with control; † $P < 0.05$ compared with NT at 4 h; ‡ $P < 0.01$ compared with NS at 4 h; § $P < 0.05$ compared with HS and NT at 24 h. (b) Direct correlation between HSP47 and matrix metalloproteinase (MMP)-9 protein expression ($R = 0.825$; $R^2 = 0.681$; $P < 0.001$; $n = 30$). The densitometry of the original blot was assessed using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

process and are associated with local and distant organ injury.⁵ In the acute phases of liver injury, there is an increased expression of MMPs, which degrades the normal liver matrix and may contribute to the pathogenesis of liver diseases.¹⁵

We have shown that hypertonic saline modulates the expression and activity of MMP-2 and MMP-9. Pancreatitis did not alter MMP-2 mRNA levels (data not shown). However, induction of pancreatitis resulted in increased protein expression of MMP-2 12 h after the induction of pancreatitis in the NS group, resulting in tissue damage. The activity of MMP-2 was also affected 12 h after the induction of pancreatitis in all groups (NS, HS and NT) and after 24 h in the NS and NT groups. Treatment with hypertonic saline recovered MMP-2 activity to basal levels.

Metalloproteinases alter cell behaviour by their effect on the ECM and may be involved in hepatic injury during pancreatitis.⁵ The protein expression of MMP-9 was increased in animals that received normal saline following acute pancreatitis. The activity of MMP-9 increased significantly between 4 and 12 h in the groups treated with normal saline and without treatment. The accumulation of ECM proteins is the result of the hepatic wound-healing response to repeated injury. Hypertonic saline significantly decreased MMP-9 protein expression and its activity compared with the NS and NT groups. However,

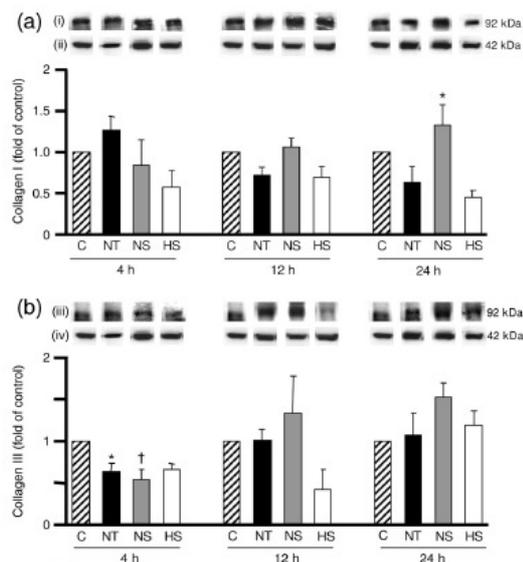


Fig. 4 Expression of Type I (a) and Type III (b) collagen was estimated in tissue homogenates by western blot. Pancreatitis was induced by retrograde infusion of 2.5% sodium taurocholate and rats were killed after 4, 12 or 24 h. C, control; NT, pancreatitis without treatment; NS, pancreatitis with normal saline treatment; HS, pancreatitis with hypertonic saline treatment. (i,iii) Representative western blots of Type I (i) and Type III (iii) collagen. (ii, iv) β -Actin was used as the loading control (100 μ g protein/lane). Data are the mean \pm SEM ($n = 4$ rats per group). * $P < 0.05$, † $P < 0.01$ compared with control. The densitometry of the original blot was assessed using ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

hypertonic saline did not affect MMP-9 mRNA levels (data not shown). In systems characterized by complex interactions, transcriptional regulation does not always indicate a reduction in biological activity or protein expression.³⁴ In addition, regulation of MMPs can occur at the level of gene transcription as well as through activation of pro-enzymes.³⁴ Our results show that hypertonic saline resuscitation after acute pancreatitis is important for maintaining a balance between MMP expression and activity in the ECM. Thus, hypertonic saline would decrease inflammation, resulting in a reduction in liver damage.

Dysregulation of the enzymatic machinery involved in ECM degradation may be an important contributing factor to the pathogenesis of many hepatic diseases.³⁴ The main component of the ECM in normal liver is collagen (Types I, III, IV and V).³⁴ In the present study, the collagen content in hepatic tissue did not differ between the HS and control groups. It is of note that in the NS and NT groups, Type III collagen levels decreased in parallel with an increase in MMP expression, probably due to digestion resulting from the increased expression of MMPs in those groups. In order to understand how ECM collagen was retained, we investigated HSP47. In the liver, hepatic stellate cells produce ECM proteins and are responsible for the expression of HSP47,³⁵ which is an intracellular chaperone protein capable of binding to gelatin, as well as to native Type I and IV collagen. In addition, HSP47 plays an important role in hepatocyte protein synthesis and regeneration. The preferential expression of HSP47 in hepatic stellate cells seems to be correlated with their ability to

generate collagens.¹⁶ Although expression of HSP47 was increased in the NS and NT groups, it remained at basal levels in the HS group. We demonstrated a strong correlation between the protein expression of HSP47 and that of MMP-9, suggesting that tissue degradation by MMPs induces the production of collagen and the expression of HSP47 following liver injury. Confirming these data, we observed an increase in Type I collagen 24 h after the induction of pancreatitis in the NS group. The degree of post-injury remodelling was greater in the NS and NT groups than in the HS group.

It is known that hypertonic saline infusion in experimental acute pancreatitis attenuates haemodynamic disturbances and systemic injuries, as well as decreasing inflammatory cytokines, preventing pancreatic infection and improving survival.⁶ In the present study, we have shown that hypertonic saline protects the liver, reducing MMP expression and activity, initially at 4 h and throughout the 24 h study period. Hypertonic saline treatment is hepatoprotective and reduces the intense demand for hepatic remodelling during pancreatitis, contributing to the integrity of the hepatic ECM. The regulation of MMP expression by hypertonic saline may have clinical relevance in pancreatitis-associated liver injury.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful for the financial support provided by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERENCES

- Hoyos S, Granell S, Heredia N, Bulbena O, Closa D, Fernandez-Cruz L. Influence of portal blood on the development of systemic inflammation associated with experimental acute pancreatitis. *Surgery* 2005; **137**: 186–91.
- Folch E, Salas A, Panes J *et al.* Role of P-selectin and ICAM-1 in pancreatitis-induced lung inflammation in rats: Significance of oxidative stress. *Ann. Surg.* 1999; **230**: 792–8.
- Tenner S, Sica G, Hughes M *et al.* Relationship of necrosis to organ failure in severe acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1997; **113**: 899–903.
- Saluja AK, Steer MLP. Pathophysiology of pancreatitis. Role of cytokines and other mediators of inflammation. *Digestion* 1999; **60** (Suppl. 1): 27–33.
- Muhs BE, Patel S, Yee H, Marcus S, Shamamian P. Increased matrix metalloproteinase expression and activation following experimental acute pancreatitis. *J. Surg. Res.* 2001; **101**: 21–8.
- Machado MC, Coelho AM, Pontieri V *et al.* Local and systemic effects of hypertonic solution (NaCl 7.5%) in experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 2006; **32**: 80–6.
- Ueda T, Takeyama Y, Takase K, Hori Y, Kuroda Y, Ho HS. Hematin is one of the cytotoxic factors in pancreatitis-associated ascitic fluid that causes hepatocellular injury. *Surgery* 2002; **131**: 66–74.
- Takeyama Y, Hori Y, Takase K, Ueda T, Yamamoto M, Kuroda Y. Apoptotic cell death of hepatocytes in rat experimental severe acute pancreatitis. *Surgery* 2000; **127**: 55–64.
- Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J. Pathol.* 2003; **200**: 504–15.
- Okamoto T, Akuta T, Tamura F, van Der Vliet A, Akaiki T. Molecular mechanism for activation and regulation of matrix metalloproteinases during bacterial infections and respiratory inflammation. *Biol. Chem.* 2004; **385**: 997–1006.
- Fu X, Kao JL, Bergt C *et al.* Oxidative cross-linking of tryptophan to glycine restrains matrix metalloproteinase activity: Specific structural motifs control protein oxidation. *J. Biol. Chem.* 2004; **279**: 6209–12.
- Wang M, Lakatta EG. Altered regulation of matrix metalloproteinase-2 in aortic remodeling during aging. *Hypertension* 2002; **39**: 865–73.
- Muhs BE, Patel S, Yee H, Marcus S, Shamamian P. Inhibition of matrix metalloproteinases reduces local and distant organ injury following experimental acute pancreatitis. *J. Surg. Res.* 2003; **109**: 110–17.
- Lamberti M, Perfetto B, Costabile T *et al.* *In vitro* evaluation of matrix metalloproteinases as predictive testing for nickel, a model sensitizing agent. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004; **195**: 321–30.
- Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2000; **279**: G245–9.
- Tasab M, Batten MR, Bulleid NJ. Hsp47: A molecular chaperone that interacts with and stabilizes correctly-folded procollagen. *EMBO J.* 2000; **19**: 2204–11.
- Snoeckx LH, Cornelussen RN, Van Nieuwenhoven FA, Reneman RS, Van Der Vusse GJ. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. *Physiol. Rev.* 2001; **81**: 1461–97.
- Tsan MF, Gao B. Cytokine function of heat shock proteins. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004; **286**: C739–44.
- Velasco IT, Pontieri V, Rocha e Silva M Jr, Lopes OU. Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. *Am. J. Physiol.* 1980; **239**: H664–73.
- Powers KA, Zurawska J, Szasz K, Khadaroo RG, Kapus A, Rotstein OD. Hypertonic resuscitation of hemorrhagic shock prevents alveolar macrophage activation by preventing systemic oxidative stress due to gut ischemia/reperfusion. *Surgery* 2005; **137**: 66–74.
- Thiel M, Buessecker F, Eberhardt K *et al.* Effects of hypertonic saline on expression of human polymorphonuclear leukocyte adhesion molecules. *J. Leukoc. Biol.* 2001; **70**: 261–73.
- Fernandes TR, Pontieri V, Moretti AI *et al.* Hypertonic saline solution increases the expression of heat shock protein 70 and improves lung inflammation early after reperfusion in a rodent model of controlled hemorrhage. *Shock* 2007; **27**: 172–8.
- Gurfinkel V, Poggetti RS, Fontes B, da Costa Ferreira Novo F, Birolini D. Hypertonic saline improves tissue oxygenation and reduces systemic and pulmonary inflammatory response caused by hemorrhagic shock. *J. Trauma* 2003; **54**: 1137–45.
- Ciesla DJ, Moore EE, Biffl WL, Gonzalez RJ, Moore HB, Silliman CC. Hypertonic saline activation of p38 MAPK primes the PMN respiratory burst. *Shock* 2001; **16**: 285–9.
- Rizoli SB, Kapus A, Fan J, Li YH, Marshall JC, Rotstein OD. Immunomodulatory effects of hypertonic resuscitation on the development of lung inflammation following hemorrhagic shock. *J. Immunol.* 1998; **161**: 6288–96.
- Junger WG, Coimbra R, Liu FC *et al.* Hypertonic saline resuscitation: A tool to modulate immune function in trauma patients? *Shock* 1997; **8**: 235–41.
- Oliveira RP, Velasco I, Soriano F, Friedman G. Clinical review: Hypertonic saline resuscitation in sepsis. *Crit. Care* 2002; **6**: 418–23.
- Horton JW, Dunn CW, Burnweit CA, Walker PB. Hypertonic saline-dextran resuscitation of acute canine bile-induced pancreatitis. *Am. J. Surg.* 1989; **158**: 48–1.
- Schmidt J, Huch K, Mithofer K *et al.* Benefits of various dextrans after delayed therapy in necrotizing pancreatitis of the rat. *Intensive Care Med.* 1996; **22**: 1207–13.
- Kondo Y, Nagai H, Kasahara K, Kanazawa K. The therapeutic effect of hypertonic solutions on the changes in the effective circulating plasma volume in acute necrotizing pancreatitis in rats. *Surg. Today* 1998; **28**: 1247–53.
- Shields CJ, Winter DC, Sookhai S, Ryan L, Kirwan WO, Redmond HP. Hypertonic saline attenuates end-organ damage in an experimental model of acute pancreatitis. *Br. J. Surg.* 2000; **87**: 1336–40.
- Chen HW, Kuo HT, Wang SJ, Lu TS, Yang RC. *In vivo* heat shock protein assembles with septic liver NF-kappaB/I-kappaB complex regulating NF-kappaB activity. *Shock* 2005; **24**: 232–8.
- Diener JRC, Rosa CM, Lins S. Acute pancreatitis: An update. *Rev. Bras. Ter. Intens.* 2004; **16**: 261–5.
- Kossakowska AE, Edwards DR, Lee SS *et al.* Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis. *Am. J. Pathol.* 1998; **153**: 1895–902.
- Kawada N, Kuroki T, Kobayashi K *et al.* Expression of heat-shock protein 47 in mouse liver. *Cell Tissue Res.* 1996; **284**: 341–6.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)