UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

Correlação dos níveis de fosfato sérico com a gravidade da pancreatite aguda grave experimental – perspectiva do sistema purinérgico

Tese de Doutorado

GUILHERME DA SILVA MAZZINI

Orientador: PROF. DR. ALESSANDRO BERSCH OSVALDT

Porto Alegre, setembro de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

Correlação dos níveis de fosfato sérico com a gravidade da pancreatite aguda grave experimental – perspectiva do sistema purinérgico

Tese apresentada para

obtenção do título de Doutor pelo

Programa de Pós-Graduação em

Medicina: Ciências Cirúrgicas

GUILHERME DA SILVA MAZZINI

Orientador: PROF. DR. ALESSANDRO BERSCH OSVALDT

Porto Alegre, setembro de 2014

CIP - Catalogação na Publicação

Mazzini, Guilherme
Correlação dos níveis de fosfato sérico com a gravidade da pancreatite aguda grave experimental – perspectiva do sistema purinérgico / Guilherme Mazzini. -- 2014.
87 f.

Orientador: Alessandro Osvaldt.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. pancreatite aguda. 2. fosfato. 3. ectonucleotidases. I. Osvaldt, Alessandro, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

ATA DE APRESENTAÇÃO DE TESE Nº 52

Aos doze dias de setembro de dois mil e quatorze, no Auditório Mário Rigatto da Faculdade de Medicina, ocorreu à apresentação pública da Tese de Doutorado intitulada **"Correlação dos níveis de fosfato sérico com a gravidade de pancreatite aguda grave experimental - perspectiva do sistema purinérgico"** do aluno **Guilherme da Silva Mazzini**, sob orientação do **Prof. Dr. Alessandro Bersch Osvaldt**. A banca foi presidida pelo orientador, Prof. Dr. Alessandro Bersch Osvaldt. Compôs a banca os Professores Dr. Carlos Otavio Corso (deste PPG), Dr. Richard Ricachenevsky Gurski (deste PPG), Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves (UFRGS), Dr. José Jukemura (USP). O candidato dispôs de 40 minutos para expor o tema. Em seguimento, o Senhor Presidente passou a palavra aos membros da Banca para arguição, cabendo ao candidato 10 minutos para responder a cada examinador. Finalizando o Senhor Presidente anunciou os conceitos emitidos pelos Senhores Membros da Banca: Prof.Dr. Carlos Otavio Corso, conceito A ;Prof. Dr. Richard Ricachenevsky Gurski, conceito A ; Prof.Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves, conceito A ;Prof. Dr. José Jukemura, conceito A . A seguir, para constar, eu, Dienes de Azeredo Bastos, Secretário, lavrei a presente ata que segue assinada pelos Professores Examinadores e pelo Professor Orientador. Por unanimidade foi concedido pela banca voto de louvor

Prof. Dr. Alessandro Bersch Osvaldt
Orientador - Presidente da Banca

Prof. Dr. Carlos Otavio Corso

Prof. Dr. Richard Ricachenevsky Gurski

Prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

Prof. Dr. José Jukemura

"Lurking in its retroperitoneal lair and enshrouded in a miasma of complex physiology, ill-understood pathology, difficult surgery, and dubious therapy, the pancreas has, for centuries, challenged the finest of scientific minds. Even to date, pancreatic physiology and especially pancreatic diseases still present more questions than answers."

Pannala R, Kidd M, Modlin IM.

Acute pancreatitis: a historical perspective. Pancreas 2009

À minha Clara, com amor.

Ao meus pais, Helena e Marcelo

Aos meus Irmãos, Marina e Gabriel

Às nossas jóias, Joana e Gaël

Ao Professor e Amigo Diogo Souza,

"um bioquímico da sensibilidade humana..."

Agradecimentos

Gostaria de agradecer àqueles que contribuíram, de diversas formas, para a realização deste estudo:

Ao **Departamento de Bioquímica da UFRGS**, por ter proporcionado meu aprendizado científico desde o segundo semestre da Faculdade de Medicina.

Ao **Dr. Tiago Falcão Cunha** por ter acreditado na ideia e me auxiliado nos primeiros experimentos.

Ao acadêmico de medicina **Luiz Cezar Pontes** por ter sido o primeiro aluno de iniciação científica a acreditar e participar deste trabalho.

Ao amigo **Dr Diego Mossmann** por ter me ensinado o modelo experimental

Ao **Sr. Jorge Alberto Lopes**, funcionário do Laboratório de Patologia Experimental do HCPA, pela presteza no processamento histológico e confecção das lâminas.

À **Prof Dra Maria Isabel Edelweiss** pela dedicação no exame histológico de incontáveis lâminas, entre idas e vindas de Nova Iorque para ver seus netinhos.

À mestre em bioquímica **Denise Ramos** pelas dosagens no HPLC.

Ao **Prof. Dr Jean Pierre Oses** pelo papel fundamental nas dosagens bioquímicas.

À **Dra Luiza Kist** e o **Prof Dr Mauricio Boggo**, do Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da PUCRS, pela ajuda com os experimentos de biologia molecular.

À **Prof. Dra Carla Bonnan**, do Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia da PUCRS, pela contribuição com seus conhecimentos sobre o sistema purinérgico.

Aos meus treinadores **Mario Leite, Maurício Boccatelli e Ken Sorgi**, por ajudarem a manter minha saúde física e por consequencia, mental.

Aos acadêmicos de medicina **Rafael Machoseki** e **Mateus Zeni** pelo trabalho e dedicação nas madrugadas de experimentos.

Ao acadêmico de medicina **Daniel Trevisan Jost** pelo brilhantismo com que me ajudou a conduzir todo o trabalho.

Ao **Prof. Dr Luis Portela (Roska)**, por tudo! Por ter podido contar com ele sempre!

Ao meu orientador, **Prof. Dr Alessandro Osvaldt**, pelos ensinamentos científicos e cirúrgicos e pelo exemplo que ele representa para os jovens cirurgiões.

Apresentação

Esta tese está organizada em 3 partes, cada uma constituída dos seguintes itens:

Parte I: Introdução, Revisão da literatura, Referências da introdução e revisão da literatura, Objetivos Geral e Específicos.

Parte II: Resultados, apresentados na forma de artigo científico em português e inglês. O artigo apresenta-se subdividido em Resumo, Introdução, Materiais e métodos, Resultados, Discussão e Referências. Ao final desta parte encontram-se as figuras do artigo.

Parte III: Considerações finais e perspectivas

Lista de abreviaturas

ADO	Adenosina
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
AP	*Acute pancreatitis*
APACHE II	*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*
ATP	Adenosina trifosfato
AU	Ácido úrico
CD39	Ectonucleotidase trifosfato difosfo-hidrolase 1
CD73	5'- nucelotidase
cDNA	DNA complementar (*complementary DNA*)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DBCA	Diretriz Brasileira para o Cuidado e Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos
DII	Doença inflamatória intestinal
DNA	Ácido desoxiribonucléico (*deoxyribonucleic acid*)
EEG	Equação de estimação generalizada
GEE	Generalized estimating equation
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (*high performance liquid chromatography*)
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
PA	Pancreatite aguda
PCR	Proteína C reativa

RM	Ressonância magnética
RNA	Ácido ribonucléico (*ribonucleic acid*)
RT-qPCR	Reação da polimerase em cadeia, quantitativa, em tempo real (*real time quantitative polimerase chain reaction*)
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (*systemic inflammatory response syndrome*)
TAP	Peptídeo de ativação do tripsinogênio (*trypsinogen activation peptide*)
TC	Tomografia computadorizada
TFA	Ácido trifluoroacético (*trifluoroacetic acid*)
TNF-a	Fator de necrose tumoral – alfa (*tumor necrosis factor- alpha*)

SUMÁRIO

Agradecimentos ..... **VII**

Apresentação ..... **IX**

Lista de abreviaturas ..... **X**

Parte I **1**

INTRODUÇÃO **2**

REVISÃO DA LITERATURA **4**

Pancreatite aguda grave **4**

Preditores de gravidade na PA **5**

Modelos experimentais de pancreatite aguda **7**

Sistema Purinérgico **10**

Referências da introdução e revisão da literatura **15**

OBJETIVOS **22**

Parte II **23**

Artigo em português **24**

Níveis de fosfato sérico aumentados se correlacionam com a gravidade da pancreatite aguda grave experimental – perspectiva do sistema purinérgico **25**

Resumo **26**

Introdução **27**

Materiais e Métodos **29**

Resultados **33**

Discussão **35**

Referências **38**

Tabela 1 ..... **41**

Legendas das figuras 42

Artigo em inglês 44

High phosphate serum levels correlate with the severity of experimental severe acute pancreatitis – insight into the purinergic system 45

Abstract 47

Introduction 48

Materials and Methods 49

Results 54

Discussion 56

References 58

Figure Legends 62

FIGURAS 64

Figura 1 65

Figura 2 66

Figura 3 67

Figura 4 68

Figura 5 69

Figura 6 70

Figura 7 71

Parte III 72

Considerações finais e perspectivas 73

Parte I

INTRODUÇÃO

A pancreatite aguda (PA) é um inflamação aguda do pâncreas, com quadro clinico variável dependente da magnitude do comprometimento das estruturas peripancreáticas e de órgãos à distância (1, 2). A reação inflamatória é iniciada com a autodigestão pancreática causando edema glandular e peripancreático, tendo um curso clínico leve em cerca de 80% dos casos (3-5). Nos casos graves, pode cursar com necrose e hemorragia levando à síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (6). Esta resposta imune, assim como a infecção, causa grande parte dos danos subsequentes, sendo responsável pela maior parte da alta morbidade e mortalidade na PA grave (7). Nestes casos, estudos clínicos demonstraram o benefício de tratamento intensivo já nas primeiras 24h de evolução (8, 9).

O conhecimento da cascata inflamatória envolvida na PA é importante para a busca de marcadores de gravidade da doença (3). Estudos observacionais demonstraram uma forte associação entre a SIRS persistente (> 48 horas) e o desenvolvimento de pancreatite grave com falência orgânica subsequente (10, 11). Os níveis séricos da proteína C reativa (PCR) comportam-se como preditores de gravidade na PA, quando determinados após 48h (12). Ainda, os níveis séricos da interleucina 6 (IL-6), dentro das primeiras 24h, apresentam uma sensibilidade de 89% a 100% e acurácia de 90% em predizer a evolução para PA grave. Entretanto, os estudos com IL-6 não foram capazes de predizer mortalidade (13, 14). A determinação precoce do prognóstico da doença baseada nos mediadores e marcadores inflamatórios ainda apresenta resultados clinicamente pouco aplicáveis, encorajando a busca de preditores de gravidade envolvidos na inflamação sistêmica.

As purinas derivadas da adenina, que compreendem os nucleotídeos adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP)

e o nucleosídio adenosina (ADO), estão envolvidas em vários mecanismos associados à resposta inflamatória sistêmica, e as enzimas que regulam sua concentração extracelular têm um efeito direto na modulação destes processos (15). A esta família de enzimas extracelulares damos o nome de ectonucleotidases. As ectonucleotidases hidrolizam ATP e ADP e AMP, até a formação do nucleosídeo ADO, liberando um fosfato a cada etapa desta cascata (16). Desta forma, controlam a concentração de nucleotídeos extracelulares e a sua sinalização em alvos celulares envolvidos na resposta inflamatória e liberam fosfato para o meio extracelular. No entanto, apesar da relevância da sinalização purinérgica e da atividade das ectonucleotidases na regulação da resposta inflamatória (17), o estudo do valor biológico do sistema purinérgico como marcador ou preditor de gravidade na PA ainda não foi explorado.

Baseado nisto, a presente tese visa estudar as possíveis alterações nos níveis séricos de fosfato e no metabolismo extracelular de nucleotídeos, em resposta à PA grave, tentando correlaciona-los com a gravidade.

REVISÃO DA LITERATURA

Pancreatite aguda grave

Aproximadamente 15% a 25% dos pacientes com PA desenvolvem pancreatite grave (4). A PA é considerada grave quando cursa com disfunção orgânica persistente, seja ela múltipla ou apenas de um sistema, como respiratório ou renal, por exemplo (6, 10, 18). A capacidade de prever a gravidade pode ajudar a identificar pacientes com risco aumentado de morbidade e mortalidade, contribuindo assim para triagem precoce para unidades de terapia intensiva e seleção de pacientes para intervenções específicas. No entanto, a determinação precoce do prognóstico dos pacientes muitas vezes permanece elusiva (19).

Diversos modelos foram desenvolvidos para predizer a gravidade da PA (1, 6). Alguns destes podem ser realizados na admissão hospitalar para auxiliar na triagem de pacientes, enquanto que outros só podem ser obtidos após as primeiras 48 a 72 horas ou ainda mais tarde. No entanto, estes modelos preditivos têm baixa especificidade, que quando combinada com a baixa prevalência de PA grave (15% a 25%) resulta em baixos valores preditivos positivos.

A avaliação de um potencial marcador prognóstico é uma tarefa difícil, e requer atenção aos detalhes no desenho, execução e interpretação dos estudos (20). Em contraste com a significância estatística e entusiasmo das interpretações de estudos experimentais e clínicos, quase nenhum dos novos marcadores descritos são adotados para o uso clínico de rotina (19).

A motivação desta tese nasce da necessidade de se desenvolver preditores de gravidade que sejam eficientes experimentalmente, de fácil transposição para estudos clínicos e, posteriormente, aplicáveis à prática médica. Trata-se de uma proposta ousada, que une as habilidades científicas de uma equipe clínica e experimental.

Preditores de gravidade na PA

Os marcadores e preditores de gravidade para a PA disponíveis podem ser divididos em clínicos, laboratoriais e radiológicos. Ainda, diversos escores foram criados levando em conta combinações variadas entre estes fatores, tais como os escores de Ranson, APACHE II (do inglês *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*) e o escore de Marshall modificado (1, 6). Os marcadores radiológicos podem ser obtidos por tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM), e servem para determinar complicações, tais como necrose e coleções peripancreáticas (18).

Preditores clínicos de gravidade

Alguns aspectos clínicos foram relacionados com evolução para PA grave em estudos observacionais . A idade avançada é um preditor de pior prognóstico, com o limite de idade variando de 55 a 75 anos (18, 21). A obesidade (definida como um índice de massa corporal > 30kg/m^2) também já foi descrita como um fator de risco para PA grave (22).

No entanto, atualmente o principal fator clínico associado a uma evolução desfavorável na PA é a falência orgânica precoce e persistente decorrente da SIRS, tendo sido descrita como um preditor de internação prolongada e aumento da mortalidade (23). Vários estudos demonstraram que a evolução e o curso clínico da falência orgânica é um preditor preciso de resultados adversos. Em um estudo de Buter A, et al., com 121 pacientes, a falência orgânica persistente e progressiva (> 48 horas) foi associada com taxas de mortalidade de 21% e 55 %, respectivamente (24). Por outro lado, a disfunção de órgãos precoce mas não persistente (<48 horas) foi associada com uma taxa de mortalidade de 0 %. Em um segundo estudo, a falência orgânica transitória

foi associada com uma taxa de mortalidade de 1,4 %, enquanto que a falência orgânica persistente teve uma taxa de mortalidade de 35% (10). A falência orgânica persistente é amplamente aceita como um critério confiável para PA grave.

Preditores laboratoriais de gravidade

Hemoconcentração: A PA grave leva a perdas significativas para o terceiro espaço, resultando em hemoconcentração com elevação do hematócrito (25).

PCR: A PCR é uma das proteínas de fase aguda produzidas pelo fígado em resposta à interleucina-1 (IL-1) e IL-6. Níveis de PCR acima de 150 mg/L em 48 horas discriminam PA grave de doença leve. (7)

Creatinina: Creatinina sérica elevada dentro das primeiras 48 horas pode prever o desenvolvimento de PA grave. Num estudo com 129 pacientes, um pico de creatinina maior que 1,8 mg/dL durante as primeiras 48 horas teve um valor preditivo positivo de 93% para o desenvolvimento de necrose pancreática (26).

Outros marcadores sorológicos: Vários outros marcadores sorológicos têm sido estudados para predizer a gravidade da pancreatite. No entanto, os testes para a maioria destes marcadores não são amplamente disponíveis, nem seus mecanismos são amplamente conhecidos. As exceções são para uma fita teste de procalcitonina, um teste para detecção do peptídeo de ativação do tripsinogênio (TAP) na urina, e um teste para tripsinogênio aniônico urinário, que tendem a se tornar disponível no mercado.

A procalcitonina é o reagente de fase aguda mais rápido. Em um estudo de validação, a tira teste de procalcitonina demonstrou uma precisão de 86 % para a previsão de PA grave (27).

O TAP é clivado a partir da extremidade amino-terminal do tripsinogênio quando a tripsina é ativada (28). Um estudo encontrou uma sensibilidade de 58 % e

especificidade de 73 % com o TAP urinário dentro de 24 horas do início dos sintomas (29).

Modelos experimentais de pancreatite aguda

Devido à localização anatômica do pâncreas e à dificuldade na obtenção de tecido em diferentes estágios do processo inflamatório em humanos, o nosso entendimento da patogênese da pancreatite baseia-se principalmente em dados de modelos experimentais com animais (30). Apesar de certas diferenças anatômicas em relação ao pâncreas humano, o pâncreas de ratos compartilha muitas semelhanças. O ducto pancreático drena para o duodeno pela papila duodenal; há uma similaridade de componentes celulares, incluindo células acinares, ductais, estreladas e endócrinas; e o pâncreas do rato também mantem função tanto exócrina como endócrina (31). Como não existe um modelo experimental ideal de PA, diversos modelos foram desenvolvidos privilegiando características específicas da PA (2), devendo ser escolhidos de acordo com o objetivo do estudo.

PA induzida por ceruleína

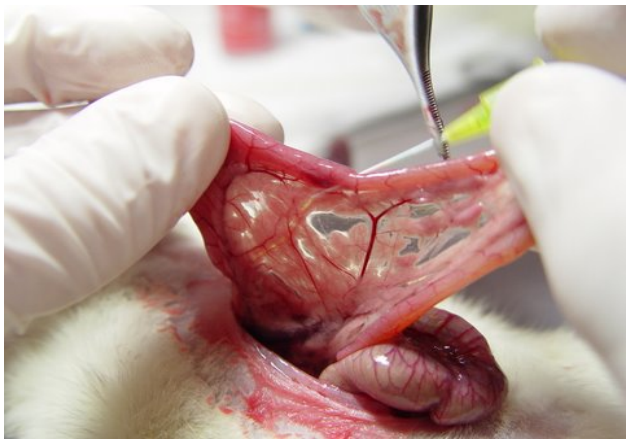
PA induzida por ceruleína é um dos modelos animais de PA mais utilizados (32). A PA é induzida por uma injeções intravenosas ou intraperitoneais de altas doses de ceruleína, diversas vezes, em intervalos de hora em hora. A ceruleína é um hormônio análogo a colecistoquinina, que induz a secreção de enzimas pancreáticas, levando à ativação das enzimas pancreáticas cerca de 30 minutos após a administração intravenosa. Muitos achados comparáveis àqueles da PA em humanos são reproduzidas no modelo de PA induzida por ceruleína, incluindo hiperamilasemia e diversas alterações histopatológicas, tais como: infiltração inflamatória no pâncreas, edema

pancreático, vacuolização das células acinares, e a presença de enzimas pancreáticas ativadas no pâncreas (33). Os resultados histopatológicos em pancreatite aguda induzida por ceruleína se assemelham aos de PA leve em seres humanos, possibilitando o estudo da ativação enzimática intracelular e mecanismos de infiltração de células inflamatórias (31).

PA induzida por sais biliares

O modelo de PA induzida por sais biliares foi primeiramente relatado por Aho, et al., (34) e tem sido amplamente aceito como um modelo representativo de PA grave, que leva à necrose pancreática e inflamação sistêmica (35). A PA é induzida inserindo-se uma cânula no ducto pancreático através da papila duodenal, e infundindo-se de forma retrógrada, uma solução de taurocolato de sódio. Imediatamente após a infusão do taurocolato de sódio inicia-se o processo de pancreatite e necrose hemorrágica no parênquima pancreático, em torno do ducto pancreático principal. Após 6 a 12 horas, já observa-se ascite e necrose hemorrágica grave do pâncreas. A vantagem deste modelo é que a necrose hemorrágica grave do pâncreas pode ser induzida em um período de tempo relativamente curto, possibilitando o estudo da resposta inflamatória sistêmica e consequente disfunção orgânica múltipla (36), bem como o estudo de marcadores de gravidade (37). Além disso, existe a possibilidade da modulação da gravidade da PA através da variação da concentração de taurocolato na solução infundida (38).

Para o nosso estudo escolhemos o modelo de infusão retrógada de taurocolato de sódio por possibilitar o estudo da PA grave com inflamação sistêmica, além da experiência prévia do grupo com o modelo (36).



Canulação do ducto pancreático para infusão retrógrada de taurocolato de sódio (foto do acervo do autor).

PA induzida por dieta deficiente em colina e suplementada com etionina

Neste modelo, uma dieta deficiente em colina e suplementada com etionina é ofertada livremente aos animais. Uma PA hemorrágica é induzida dentro de cerca de 5 dias, com uma taxa de mortalidade atingindo quase 100% (39). A desvantagem deste modelo experimental é que a ocorrência da PA é limitada a ratos fêmeas jovens. No entanto, uma taxa de mortalidade relativamente constante é altamente vantajosa para avaliar a eficácia de novos medicamentos a serem desenvolvidos para o tratamento de pancreatite.

PA induzida por L-arginina

L-arginina é um aminoácido que tem sido usado para induzir PA grave necrotizante em ratos, conforme descrito por Tani, et al. (40). Uma única injeção intraperitoneal de uma dose excessiva de L-arginina (500 mg/100 g de peso corporal) induz PA necrosante em ratos. O exame histológico revela alterações degenerativas de organelas intracelulares e núcleos de células acinares. No entanto, o mecanismo patogênico ainda não é totalmente compreendido.

Modelo da ligadura do ducto pancreático

Quando o ducto pancreático é ligado em ratos, os resultados iniciais, tais como o edema pancreático, infiltração de células inflamatórias, hiperamilasemia, são compatíveis PA (41). No entanto, com o tempo estes resultados são substituídos por achados consistentes com pancreatite crônica, tal como atrofia, perda das células acinares e fibrose.

Isquemia Pancreática

O comprometimento vascular do pâncreas pode ser realizado através da ligadura da irrigação arterial do pâncreas (tronco celíaco, artéria mesentérica superior, artéria gastroduodenal), ligadura da drenagem venosa (veia esplênica, veias gástricas curtas, veia gastroepiplóica esquerda), administração de microesferas e choque hemorrágico, produzindo desde pancreatite aguda edematosa até necro-hemorrágica com esteatonecrose (42). Uma das utilidades dos modelos de isquemia é possibilitar o estudo das alterações de isquemia e reperfusão no pâncreas (43).

Sistema Purinérgico

As purinas estão entre os compostos bioquímicos mais antigos e influentes na história evolutiva (44). O ATP, por exemplo, é a fonte de energia universal das reações biológicas intracelulares. O foco desta tese são os nucleotídeos derivados da adenina, que compreendem ATP, ADP, AMP e o nucleosídeo ADO.

Os primeiros relatos sobre a sinalização purinérgica datam por volta de 1929, quando foram injetados, via intravenosa, extratos de tecidos cardíacos em animais e observou-se a diminuição transitória da frequência cardíaca; posteriormente identificou-se o agente biológico como um "composto de adenina" (45). Pesquisas

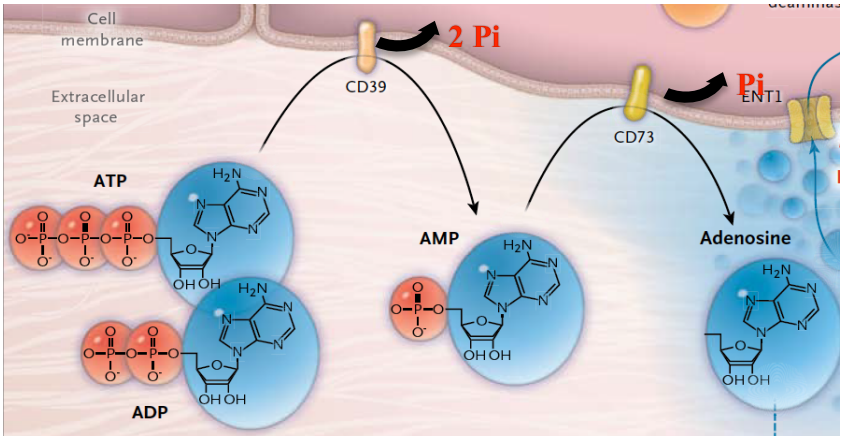
adicionais tem conduzido à descoberta de diversos efeitos biológicos da sinalização do ATP, ADP, e da ADO, agindo através de seus receptores específicos. A ADO pode ser derivada do ATP e ADP através da ação de enzimas localizadas na superfície externa de membranas celulares. Uma vez que os receptores de ATP e ADP e os receptores para ADO geralmente geram efeitos opostos, a resposta celular resultante é atribuível tanto à proporção entre a concentração de ATP e ADP para a concentração de ADO, quanto à expressão e intensidade de sinalização dos seus receptores (46).

Liberação e metabolismo extracelular dos nucleotídeos

No seu estado fisiológico, as células dos mamíferos contem altas concentrações de ATP, e condições patológicas, tais como inflamação, necrose ou isquemia, causam a liberação do ATP intracelular (47). O ATP e ADP liberados podem ligar-se a receptores específicos, influenciando muitos processos biológicos, incluindo agregação plaquetária, tônus vascular e função cardíaca (48). Durante a apoptose, pode ocorrer uma liberação controlada de ATP, funcionando como um sinal quimiotático para macrófagos (49). Ainda, as células endoteliais e células inflamatórias ativadas, tais como neutrófilos, também liberam ATP (48), e as plaquetas liberam purinas na forma de ADP a partir de grânulos intracelulares (47).

No espaço extracelular, ATP e ADP são rapidamente metabolizados em AMP, que por sua vez é metabolizado a ADO (50). Esta hidrólise de nucleotídeos envolve um processo enzimático em duas etapas, regulado por enzimas chamadas ectonucleotidases. No primeiro passo, o ATP e ADP são convertidos em AMP pela ectonucleotidase trifosfato difosfo-hidrolase 1 (CD39). Numa segunda etapa da geração extracelular de ADO, a enzima 5'-nucleotidase (CD73) converte o AMP extracelular em

ADO. É importante ressaltar que a hidrólise dos nucleotídeos libera fosfato para o meio extracelular em cada etapa da conversão do ATP e ADP até ADO.



Adaptado de Eltzschig HK, et al., 2012 (50).

Estudos experimentais demonstraram que animais com deleção genética tanto de CD39 como de CD73 são viáveis, indicando que a hidrólise dependente destas enzimas não é vital em condições fisiológicas. No entanto, animais CD39 $^{-/-}$ apresentam elevação nos níveis de ATP e ADP extracelular, combinados com baixos níveis de ADO, com aumento da susceptibilidade para o desenvolvimento de inflamação em estados patológicos (51). Em humanos, os polimorfismos que diminuem a expressão da ectonucleotidase CD39 levam ao aumento da susceptibilidade a DII e esclerose múltipla (52, 53). Camundongos CD73 $^{-/-}$ tem a sinalização de ADO atenuada, enquanto que os níveis de ATP e ADP extracelulares permanecem quase inalterados. A falta de sinalização de ADO extracelular nestes camundongos causa susceptibilidade para inflamação induzida por hipóxia (54), e disfunção da barreira vascular intestinal (55). Estudos farmacológicos usando compostos que aumentam a conversão de ATP e ADP extracelular em ADO mostram efeitos terapêuticos em animais com alterações inflamatórias ou isquemia (56, 57).

Sinalização extracelular da ADO

A sinalização da ADO pode dar-se através de quatro receptores acoplados à proteína G distintos: o receptor de ADO A1, o receptor de ADO A2a, o receptor de ADO A2b, e o receptor de ADO A3 (50). Os subtipos de receptores de ADO são distribuídos de forma diferente em cada célula. Por exemplo, o A2b é altamente expresso em células endoteliais vasculares, (58), enquanto o A2a é altamente expresso em células do sistema imunológico, tais como neutrófilos e linfócitos (58). No final da sinalização, a ADO é transportada para o compartimento intracelular. Este transporte envolve canais de difusão que permitem adenosina para atravessar a membrana celular de acordo com o gradiente de concentração (50), sendo rapidamente metabolizada dentro do compartimento intracelular.

Ainda não foram descritas doenças relacionadas a defeitos ou mutações de qualquer um dos quatro receptores de ADO. Camundongos knockout para o receptor de adenosina são viáveis, indicando redundância do sistema sob condições fisiológicas. Em contraste, muitas funções biológicas foram identificados para cada receptor, sob condições patológicas. Por exemplo, os efeitos cronotrópicos da ADO, que são críticos para o tratamento da taquicardia supraventricular, são dependentes do receptor A1 (59). Estudos farmacológicos em humanos mostram funções anti-inflamatórias da sinalização via A2a em neutrófilos (60). O A2a desempenha um papel crítico na atenuação da ativação celular inflamatória em vários tecidos (61).

Purinas na PA

Dois estudos experimentais associaram a sinalização da ADO com a gravidade da PA (62, 63). No estudo de Celiński K, et al., foi injetado CGS 21680, um agonista dos receptores A2a, em ratos submetidos a pancreatite aguda induzida pela

infusão retrógrada de taurocolato de sódio a 5% (62). O grupo foi comparado com ratos tratados com ZM 241385, um antagonista dos receptores A2a, com ratos não tratados e com ratos controles. A administração de CGS 21680 resultou na diminuição da infiltração de células inflamatórias, alterações hemorrágicas, necrose e a vacuolização das células acinares, sem um efeito evidente sobre o edema do tecido intersticial. A administração de ZM 241385 não afetou os escores das alterações necro-hemorrágica e infiltrado inflamatório, mas diminuiu a vacuolização e edema. Em todos os grupos, a expressão de receptores A2a, avaliada por imuno-histoquímica, foi semelhante. No estudo de Prozorow-Krol B, et al., foi injetado IB-MECA, um agonista dos receptores A3, em ratos submetidos a pancreatite aguda induzida pela infusão retrógrada de taurocolato de sódio a 5% (63). O grupo foi comparado com ratos não tratados e com ratos controle. A administração do IB-MECA também atenuou os parâmetros histológicos de inflamação em comparação com o grupo não tratado.

Estes dois trabalhos levantam a hipótese de que a ADO possa ter um papel anti-inflamatório na pancreatite aguda, e que a manipulação dos seus receptores possa ser um alvo para terapias farmacológicas.

Referências da introdução e revisão da literatura

1. Osvaldt AB, Viero P, Borges da Costa MS, Wendt LR, Bersch VP, Rohde L. Evaluation of Ranson, Glasgow, APACHE-II, and APACHE-O criteria to predict severity in acute biliary pancreatitis. International surgery. 2001;86:158-161.

2. Pandol SJ, Saluja AK, Imrie CW, Banks PA. Acute Pancreatitis: Bench to the Bedside. Gastroenterology. 2007;133:1056.e1-1056.e25.

3. Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. The Journal of pathology. 2000;190:117-125.

4. Isenmann R, Beger HG. Natural history of acute pancreatitis and the role of infection. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 1999;13:291-301.

5. Neoptolemos JP, Raraty M, Finch M, Sutton R. Acute pancreatitis: the substantial human and financial costs. Gut. 1998;42:886-891.

6. Banks PA, Bollen TL, Dervenis C et al. Classification of acute pancreatitis—2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. Gut. 2013;62:102-111.

7. Papachristou GI, Whitcomb DC. Inflammatory markers of disease severity in acute pancreatitis. Clin Lab Med. 2005;25:17-37.

8. Fogel EL, Sherman S. ERCP for gallstone pancreatitis. N Engl J Med. 2014;370:150-157.

9. Phillip V, Steiner JM, Algul H. Early phase of acute pancreatitis: Assessment and management. World J Gastrointest Pathophysiol. 2014;5:158-168.

10. Johnson CD, Abu-Hilal M. Persistent organ failure during the first week as a marker of fatal outcome in acute pancreatitis. Gut. 2004;53:1340-1344.

11. Johnson CD, Besselink MG, Carter R. Acute pancreatitis. BMJ. 2014;349:g4859.

12. Heath DI, Cruickshank A, Gudgeon M, Jehanli A, Shenkin A, Imrie CW. Role of interleukin-6 in mediating the acute phase protein response and potential as an early means of severity assessment in acute pancreatitis. Gut. 1993;34:41-45.

13. Brivet FG, Emilie D, Galanaud P. Pro-and anti-inflammatory cytokines during acute severe pancreatitis: an early and sustained response, although unpredictable of death. Critical care medicine. 1999;27:749-755.

14. Chen C-C, Wang S-S, Lee F-Y, Chang F-Y, Lee S-D. Proinflammatory cytokines in early assessment of the prognosis of acute pancreatitis. The American journal of gastroenterology. 1999;94:213-218.

15. Kannan S. E-NTPase/NTPDase: potential role as a regulatory element in inflammation. Medical Hypotheses. 2002;58:527-528.

16. Zimmermann H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. Drug Development Research. 2001;52:44-56.

17. Mizumoto N, Kumamoto T, Robson SC et al. CD39 is the dominant Langerhans cell–associated ecto-NTPDase: Modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. Nature medicine. 2002;8:358-365.

18. IAP/APA evidence-based guidelines for the management of acute pancreatitis. Pancreatology. 2013;13:e1-15.

19. Sigounas DE, Tatsioni A, Christodoulou DK, Tsianos EV, Ioannidis JP. New prognostic markers for outcome of acute pancreatitis: overview of reporting in 184 studies. Pancreas. 2011;40:522-532.

20. Hlatky MA, Greenland P, Arnett DK et al. Criteria for evaluation of novel markers of cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart

Association. Circulation. 2009;119:2408-2416.

21. Frey CF, Zhou H, Harvey DJ, White RH. The incidence and case-fatality rates of acute biliary, alcoholic, and idiopathic pancreatitis in California, 1994-2001. Pancreas. 2006;33:336-344.

22. Martinez J, Johnson CD, Sanchez-Paya J, de Madaria E, Robles-Diaz G, Perez-Mateo M. Obesity is a definitive risk factor of severity and mortality in acute pancreatitis: an updated meta-analysis. Pancreatology. 2006;6:206-209.

23. Isenmann R, Rau B, Beger HG. Early severe acute pancreatitis: characteristics of a new subgroup. Pancreas. 2001;22:274-278.

24. Buter A, Imrie CW, Carter CR, Evans S, McKay CJ. Dynamic nature of early organ dysfunction determines outcome in acute pancreatitis. Br J Surg. 2002;89:298-302.

25. Lankisch PG, Mahlke R, Blum T et al. Hemoconcentration: an early marker of severe and/or necrotizing pancreatitis? A critical appraisal. Am J Gastroenterol. 2001;96:2081-2085.

26. Muddana V, Whitcomb DC, Khalid A, Slivka A, Papachristou GI. Elevated serum creatinine as a marker of pancreatic necrosis in acute pancreatitis. Am J Gastroenterol. 2009;104:164-170.

27. Kylanpaa-Back ML, Takala A, Kemppainen E, Puolakkainen P, Haapiainen R, Repo H. Procalcitonin strip test in the early detection of severe acute pancreatitis. Br J Surg. 2001;88:222-227.

28. Sah RP, Dawra RK, Saluja AK. New insights into the pathogenesis of pancreatitis. Curr Opin Gastroenterol. 2013;29:523-530.

29. Neoptolemos JP, Kemppainen EA, Mayer JM et al. Early prediction of severity in acute pancreatitis by urinary trypsinogen activation peptide: a multicentre

study. Lancet. 2000;355:1955-1960.

30. Lerch MM, Gorelick FS. Models of acute and chronic pancreatitis. Gastroenterology. 2013;144:1180-1193.

31. Hyun JJ, Lee HS. Experimental models of pancreatitis. Clin Endosc. 2014;47:212-216.

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

33. Yamaguchi H, Kimura T, Mimura K, Nawata H. Activation of proteases in cerulein-induced pancreatitis. Pancreas. 1989;4:565-571.

34. Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. Scand J Gastroenterol. 1980;15:411-416.

35. Aho HJ, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat: ultrastructure of sodium taurocholate-induced pancreatic lesions. Scandinavian journal of gastroenterology. 1980;15:417-424.

36. Mossmann Dda F, Edelweiss MI, Kulczynski JM, Marroni NA, Kretzmann NA, Antunes C, Birkhan OA, Osvaldt AB. Effects of gadolinium chloride on sodium taurocholate-induced pancreatitis in rats. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões. 2010;37:288-294.

37. Llimona F, de Lima TM, Moretti AI et al. PGC-1alpha expression is increased in leukocytes in experimental acute pancreatitis. Inflammation. 2014;37:1231-1239.

38. Schmidt J, Rattner DAVIDW, Lewandrowski K et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. Annals of surgery. 1992;215:44.

39. Lombardi B, Estes LW, Longnecker DS. Acute hemorrhagic pancreatitis

(massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with a choline-deficient diet. Am J Pathol. 1975;79:465-480.

40. Tani S, Itoh H, Okabayashi Y et al. New model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive doses of arginine in rats. Dig Dis Sci. 1990;35:367-374.

41. Ohshio G, Saluja A, Steer ML. Effects of short-term pancreatic duct obstruction in rats. Gastroenterology. 1991;100:196-202.

42. Waldner H. Vascular mechanisms to induce acute pancreatitis. Eur Surg Res. 1992;24 Suppl 1:62-67.

43. Le Campion ER, Jukemura J, Coelho AM, Patzina R, Carneiro DLA. Effects of intravenous administration of pentoxifylline in pancreatic ischaemia-reperfusion injury. HPB (Oxford). 2013;15:588-594.

44. Miller SL, Harold CL. Organic compound synthes on the primitive earth. Science. 1959;130:251.

45. Drury AN, Szent-Györgyi AV. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. The Journal of physiology. 1929;68:213-237.

46. Burnstock G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. Pharmacol Rev. 2006;58:58-86.

47. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion [mdash] from mechanism to translation. Nature medicine. 2011;17:1391-1401.

48. Gordon JL. Extracellular ATP: effects, sources and fate. Biochemical Journal. 1986;233:309.

49. Ravichandran KS. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. Immunity. 2011;35:445-455.

50. Eltzschig HK, Sitkovsky MV, Robson SC. Purinergic signaling during inflammation. N Engl J Med. 2012;367:2322-2333.

51. Köhler D, Eckle T, Faigle M et al. CD39/ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 provides myocardial protection during cardiac ischemia/reperfusion injury. Circulation. 2007;116:1784-1794.

52. Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L et al. CD39+ Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. The Journal of Immunology. 2009;183:7602-7610.

53. Friedman DJ, Künzli BM, A-Rahim YI et al. CD39 deletion exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009;106:16788-16793.

54. Eltzschig HK, Thompson LF, Karhausen J et al. Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism. Blood. 2004;104:3986-3992.

55. Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM et al. Ecto-5′-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. Journal of Clinical Investigation. 2002;110:993-1002.

56. Eckle T, Krahn T, Grenz A et al. Cardioprotection by ecto-5′-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine receptors. Circulation. 2007;115:1581-1590.

57. Reutershan J, Vollmer I, Stark S, Wagner R, Ngamsri K-C, Eltzschig HK. Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators in LPS-induced PMN trafficking into the lungs. The FASEB Journal. 2009;23:473-482.

58. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and

classification of adenosine receptors—an update. Pharmacological reviews. 2011;63:1-34.

59. Koeppen M, Eckle T, Eltzschig HK. Selective deletion of the A1 adenosine receptor abolishes heart-rate slowing effects of intravascular adenosine in vivo. PLoS One. 2009;4:e6784.

60. Cronstein BN, Daguma L, Nichols D, Hutchison AJ, Williams M. The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O2 generation, respectively. J Clin Invest. 1990;85:1150-1157.

61. Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. Nature. 2001;414:916-920.

62. Celinski K, Prozorow-Krol B, Korolczuk A et al. The role of adenosine A2a receptors in experimental acute pancreatitis. Adv Med Sci. 2006;51:105-110.

63. Prozorow-Krol B, Korolczuk A, Czechowska G, Slomka M, Madro A, Celinski K. The effects of the adenosine A3 receptor agonist IB-MECA on sodium taurocholate-induced experimental acute pancreatitis. Arch Pharm Res. 2013;36:1126-1132.

OBJETIVOS

Geral

Correlacionar os níveis séricos de fosfato com a gravidade da pancreatite aguda experimental induzida por tauracolato de sódio, em ratos. Além disso, avaliar o sistema purinérgico extracelular na pancreatite aguda grave através dos níveis séricos de purinas extracelulares e da atividade das ectonucleotidases, buscando a correlação com os níveis séricos de fosfato e com as alterações do tecido pancreático.

Específicos

1. Avaliar a variação temporal dos níveis séricos de fosfato na pancreatite aguda grave induzida por taurocolato de sódio em ratos;
2. Correlacionar os níveis séricos de fosfato com o escore de gravidade da pancreatite aguda, avaliado por histopatologia;
3. Avaliar o perfil temporal dos níveis séricos de purinas na pancreatite aguda grave induzida por taurocolato de sódio em ratos;
4. Correlacionar os níveis séricos de fosfato com os de purinas extracelulares para avaliar uma possível correlação entre alterações no sistema purinérgico extracelular e os níveis de fosfato séricos;
5. Avaliar a atividade da degradação de nucleotídeos extracelulares na pancreatite aguda induzida por taurocolato de sódio em ratos;
6. Avaliar a expressão da enzima 5'-nucleotidase e do receptor A2a de ADO no tecido pancreático de ratos com pancreatite aguda grave induzida por taurocolato de sódio.

Parte II

Artigo em português

Níveis de fosfato sérico aumentados se correlacionam com a gravidade da pancreatite aguda grave experimental – perspectiva do sistema purinérgico

Guilherme S. Mazzini[1,2], MD; Daniel T. Jost[2]; Denise B. Ramos, MS[2]; Jean P. Oses, PhD[3]; Mateus A. Zeni[1]; Rafael Machoseki[2]; Luiza W. Kist[4,5], PhD; Mauricio R. Boggo[4,5], PhD; Carla D. Bonnan[6,5], PhD; Maria I. Edelweiss, MD, PhD[1]; Marta M. Duarte[7], PhD; Luis V. Portela[2], PhD; Diogo O. Souza[2], MD, PhD; Alessandro B. Osvaldt[1,8], MD, PhD.

1 Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

2 Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

3 Laboratório de Neurociências Clínicas, ICBS, Centro de Ciências Da Vida E Da Saúde, Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

4 Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

5 Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), Porto Alegre, RS, Brasil.

6 Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

7 Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brasil.

8 Serviço de Cirurgia Digestiva do Hospital de Clinicas de Porto Aelgre, Porto Alegre, RS, Brasil

Os autores declaram que não há conflitos de interesse a divulgar, e gostariam de agradecer o apoio financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos - FIPE / HCPA, INCT-EN/CNPQ, IBN Net, FAPERGS e CAPES.

Resumo

Objetivos: As purinas extracelulares fazem parte da resposta inflamatória sistêmica. Seus níveis são modulados por ectonucleotidases, e a hidrólise dos nucleotídeos libera fosfato. Nosso estudo procurou determinar se os níveis séricos de fosfato são preditores da gravidade da pancreatite agua (PA) e se eles se correlacionam com o metabolismo extracelular de purinas.

Métodos: A PA foi induzida em ratos Wistar, através da injeção retrograda de taurocolato de sódio. O grupo da PA foi comparado com animais submetidos a um modelo de sepse abdominal por ligadura e punção do ceco. O grupo sham foi submetido a laparotomia e fechamento. Foram medidos os níveis séricos de fosfato e purinas, e a expressão da enzima 5'-nucleotidase (CD73) e do receptor de adenosina A2a no tecido pancreático por RT-qPCR.

Resultados: Os níveis séricos de fosfato foram mais altos na PA grave, e se correlacionaram com o escore de gravidade. A PA grave também resultou em níveis séricos aumentados de ADP, AMP e adenosina. Ainda, a conversão de AMP em adenosina, no soro, estava acelerada nos grupos da PA. Observou-se uma correlação positiva dos níveis séricos de adenosina e fosfato, nos grupos de PA. A expressão da enzima CD73 e do receptor de adenosina A2a no pâncreas não estava alterada.

Conclusão: Nosso estudo sugere que os níveis séricos de fosfato se correlacionam com a gravidade da PA e indica que as purinas extracelulares devem estar envolvidas na resposta sistêmica associada à PA grave.

Palavras Chave: pancreatite aguda, necrose pancreática; purinas; fosfato; pancreatite experimental.

Introdução

A tarefa de predizer a gravidade da pancreatite aguda (PA) precocemente continua sendo um desafio para médicos e pesquisadores (1). A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) é uma das principais causas de morbidade na PA grave, e diversos estudos investigaram marcadores inflamatórios como potenciais preditores de gravidade (2,3). No entanto apesar do sistema purinérgico ser bem descrito como um componente da resposta inflamatória sistêmica em desordens como isquemia e reperfusão e doença inflamatória intestinal (DII) (4,5), as purinas extracelulares ainda não foram estudadas como potenciais marcadores periféricos de gravidade na PA.

Os nucleotídeos adenosina trifosfato (ATP) e adenosina difosfato (ADP) são liberados pelo endotélio, neutrófilos, plaquetas e células necróticas e apoptóticas em condições patológicas com isquemia, hipóxia e inflamação, agindo como moléculas sinalizadoras (6). No espaço extracelular, o ATP e o ADP são hidrolisados a adenosina monofosfato (AMP) que, em seguida, é hidrolisado a adenosina (ADO), sequencialmente liberando um fosfato em cada conversão. Enzimas chamadas ectonucleotidases são responsáveis por este processo (6). ATP e ADP são convertidos em AMP pela enzima ectonucleotidase trifosfato difosfo-hidrolase 1 (CD39). Subsequentemente, a enzima 5'-nucleotidase (CD73) rapidamente converte o AMP extracelular em ADO, que por sua vez age através de receptores específicos (A1, A2a, A2b, A3) (7).

Como consequência deste processo enzimático coordenado, as ectonucleotidases contribuem para a modulação da resposta inflamatória através do controle dos níveis extracelulares de purinas (8). O aumento da produção extracelular de ADO foi descrito como um mecanismo anti-inflamatório fisiológico secundário à inflamação sistêmica (9). Em modelos experimentais de sepse e colite, por exemplo, a

ADO promove respostas protetoras nos tecidos (10, 5). Especificamente relacionado à PA, dois estudos experimentais demonstraram a modulação da gravidade da PA via receptores de ADO. Utilizando um modelo experimental de PA em ratos induzida por taurocolato de sódio, os autores demonstraram a atenuação dos achados inflamatórios histológicos no pâncreas, após a administração de um agonista do receptor A2a de ADO (11). Um efeito similar foi descrito utilizando um agonista do receptor A3 de ADO (12).

Considerando a possível relação entre as purinas extracelulares e a PA, nosso grupo levantou a hipótese de que o metabolismo purinérgico extracelular poderia estar acelerado na PA, em correlação com a gravidade do processo. Ainda, os níveis séricos de fosfato estariam aumentados em decorrência do aumento da hidrólise extracelular de nucleotídeos pelas ectonucleotidases. Corroborando esta hipótese, um relato de caso publicado por Birkenfeld AL, et al., descreveu um paciente com uma hiperfosfatemia sem causa aparente, no qual a tomografia computadorizada evidenciou uma PA grave, necro-hemorrágica (13). Os autores não souberam explicar a causa da hiperfosfatemia.

No presente estudo, foi examinado o papel do nível sérico de fosfato como preditor de gravidade na PA, utilizando um modelo experimental de PA em ratos, induzida pela injeção retrógrada de taurocolato de sódio. Adicionalmente, nós correlacionamos as alterações do fosfato com o metabolismo purinérgico extracelular. Para excluir o efeito da resposta inflamatória sistêmica inespecífica e isolar o efeito da PA, nós comparamos os resultados dos animais com PA com animais submetidos a um modelo experimental de sepse abdominal.

Materiais e Métodos

Animais e cirurgias

Foram utilizados ratos Wistar machos (com 100 a 120 dias e 300 a 350g), mantidos num ciclo de 12h claro e 12h escuro e temperatura constante de 22ºC, com água e ração com 20% de proteína, *ad libitum*. Todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA). Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia com cetamina 50 mg/kg e xilazina 20 mg/kg, intraperitonial. PA foi induzida através da injeção retrograda de uma solução de taurocolato de sódio no ducto bilio-pancreático (14). O grupo com PA foi dividido em 2 subgrupos – Pan 3% (n=10) e Pan 1,5% (n=10) - com duas concentrações diferente de taurocolato de sódio (3% e 1,5% respectivamente), no intuito de causar diferentes graus de gravidade, com a solução de 3% devendo gerar uma PA mais grave que a de 1,5%. O grupo da sepse (n=10) foi submetido ao modelo experimental de sepse abdominal grave através da ligadura e punção do ceco (15), com a ligadura de 75% do ceco e 2 punções com agulha 18G. O grupo sham (n=10) foi submetido a anestesia, laparotomia e fechamento da parede abdominal.

O sangue foi coletado da cauda antes da cirurgia (tempo 0h) e após 3h. No tempo 12h os animais foram anestesiados, o sangue foi coletado por punção cardíaca, o pâncreas foi excisado e os animais foram submetidos a eutanásia. Uma porção do pâncreas foi colocada em Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) para análise da expressão gênica, e o resto do tecido pancreático foi fixado em solução de formalina tamponada a 10% para análise histológica. As amostras de sangue foram centrifugadas e o soro foi congelado a -70ºC para posterior análise.

O diagnóstico de PA foi definido como um aumento na concentração da amilase sérica maior que 3 vezes o nível basal. Os animais que não desenvolveram PA foram excluídos.

Gravidade da pancreatite

As lâminas de tecido pancreáticos de todos os grupos foram coradas com hematoxilina e eosina, numeradas randomicamente e examinadas por um patologista cegado para o grupo dos animais. A gravidade da pancreatite foi determinada através de uma escala adaptada de Schimidt J, et al., (16) na qual sete aspectos foram graduados de 0 a 4 (escore total de 0 a 28): edema, necrose acinar, esteatonecrose, hemorragia no parênquima, hemorragia na gordura, infiltrado inflamatório intralobular e infiltrado inflamatório perivascular.

Ensaios bioquímicos

O fosfato sérico foi determinado usando-se um ensaio colorimétrico com verde malaquita, descrito por Chan KM, et al. (17). O fator de necrose tumoral alfa (TNF-a) foi determinado utilizando o kit comercial ELISA Ready-SET-Go!® (Ebioscience). O cálico sérico foi determinado por ensaio colorimétrico utilizando o kit comercial Cálcio Arsenazo III (Katal Biotecnológica). A amilase no soro foi determinada por ensaio colorimétrico através do kit Amilase (Labtest).

Purinas séricas

A concentração de purinas no soro desproteinizado foi determinada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC – *high performance liquid chromatography*), conforme descrito por Böhmer et al. (18). As seguintes purinas foram

medidas: ATP, ADP, AMP, ADO e ácido úrico (AU). As análises foram realizadas com um sistema de cromatografia Shimadzu Class-VP, constituído por uma bomba de gradiente quaternário com desgaseificação a vácuo e módulos de dessalinização com pistão, uma válvula auto injetora Shimadzu SIL-10AF com uma alça de 50 mL e um detector de ultra violeta (UV). As separações foram realizadas numa coluna Supelcosil® LC-18, 5 mM - com 250 mm x 4,6 mm (Supelco, St Louis, MO, EUA). A fase móvel fluiu a 1,2 mL/min, e a temperatura da coluna foi de 24 ° C. A composição do tampão permaneceu inalterada (A: tampão de fosfato 150 mmol/L, pH 6,0, contendo 150 mmol/L de cloreto de potássio; B: 15% de acetonitrilo em tampão A). O perfil do gradiente foi modificado para a seguinte composição de tampão B na fase móvel: 0% em 0,00 min, 2% em 0,05 min, 7% em 2,45 min, 50% em 10,00 min, 100% em 11,00 min, e 0% em 12h40min. Amostras de 50 µL foram injetadas na alça da válvula de injeção. A absorbância foi lida em 254 nm.

Atividade da 5'-nucleotidase no soro

Amostras de 10 µL de soro do tempo 12h, de todos os grupos, foram incubadas com 130 µL de solução tampão de Tris-HCl 205 mM a 37 °C durante 10 min. A reação foi iniciada com adição de 60 µL de solução 0,1 mM de AMP (volume final para cada amostra foi de 200 µL). Imediatamente após a adição de AMP, foram coletados 100 µL da solução, e a reação foi parada com uma solução a 14% de ácido trifluoroacético (TFA) (tempo 0). O restante da solução foi incubada durante 10 min a 37 °C. A reação então foi interrompida com uma solução a 14% de TFA (tempo 10). As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi congelado a -70ºC para posterior análise por HPLC, conforme descrito acima.

Análise da expressão gênica

A expressão gênica foi determinada pela reação da polimerase em cadeia quantitativa em tempo real (RT-qPCR - *quantitative real time polymerase chain reaction*). O RNA total foi isolado com Trizol® de acordo com as instruções do fabricante, quantificado por espectrofotometria, e o cDNA foi sintetizado com o sistema de transcrição reversa ImProm-II® (Promega) a partir de 1 μg de RNA total, seguindo as instruções do fabricante. PCR quantitativa foi realizada utilizando SYBR® Green I (Invitrogen) para detectar a síntese de cDNA de cadeia dupla. As reações foram realizadas num volume de 25 μL utilizando 12,5 μL de cDNA diluído (1:50 para *Gapd, Rlp13α, Hprtl, cd73* e *A2a*), contendo uma concentração final de 5 M de betaína (Sigma-Aldrich), 0,2 x SYBR® Green I (Invitrogen), 100 μM de dNTP, 1 x tampão de PCR, 3 mM de $MgCl_2$, 0,25 U de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 200 nM de cada *primer* direto e reverso (Tabela 1). As condições dos ciclos de PCR foram as seguintes: uma etapa inicial de ativação da polimerase durante 5 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C para desnaturação, 35 segundos a 60 °C para hibridização e 15 segundos a 72 °C para extensão. Ao final do protocolo de ciclagem, uma análise da curva de fusão foi incluída, e a fluorescência foi medida entre 60-99 °C. Os níveis de expressão relativa foram determinados com 7500 Fast Real-Time System Sequence Detection Software v.2.0.5 (Applied Biosystems). A eficiência por amostra foi calculada usando software LinRegPCR 11,0 (http://LinRegPCR.nl), e a estabilidade dos genes referências, *Gapd, Rlp13α e Hprt1 (M-value)*, e o número ótimo de genes de referência de acordo com variação pairwise (*V*) foram analisados com o software GeNorm 3.5 (http://medgen.ugent.be/genorm/). Os níveis de expressão relativa do RNA foram determinados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando SPSS para Windows 18 (IBM Corporation). Os resultados são expressos como média ± DP. Após o teste de Shapiro-Wilk, os resultados foram analisados por equações de estimação generalizada (EEG), seguido pelo teste post-hoc de Bonferroni. A atividade da 5'-nucleotidase em soro foi analisado com o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post-hoc de Dunn. As correlações foram feitas por meio do coeficiente de Spearman. Um valor de $p<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Os achados histopatológicos são resumidos na Figura 1. A amilase sérica alcançou os níveis de diagnóstico de PA em todos os animais submetidos a infusão de taurocolato, menos em um, que foi excluído. Ocorreu aumento estatisticamente significativo em 3h e 12h apenas nos grupos Pan 3% e Pan 1,5%, e não foi diferente entre estes grupos (Figura 2A). A escala de gravidade demonstrou alteração somente nos grupos de PA, mas não foi significativamente diferente entre os grupos de PA. No entanto, houve animais predominantemente menos graves no grupo Pan 1,5% e animais predominantemente mais graves no grupo Pan 3%, ampliando o espectro de gravidade em nosso experimento (Figura 2B). Para demonstrar que ambos os modelos experimentais resultaram em inflamação sistêmica, medimos a níveis séricos de TNF-a. Houve um aumento significativo em todos os grupos após 12h em comparação com o tempo 0h, o que reflete um estado inflamatório sistêmico devido tanto à PA como à sepse ou à cirurgia apenas. Além disso, os níveis de TNF-a no soro foram significativamente diferentes entre todos os grupos, em 12h, com os níveis mais altos no grupo Pan 3%, seguido pelo grupo Pan 1,5%, o grupo sepse e os níveis mais baixos no

grupo sham (Figura 2C). Os níveis séricos de cálcio não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (dados não mostrados).

Fosfato sérico e gravidade da PA

Os níveis séricos de fosfato não foram diferentes entre os grupos, nos tempos 0h e 3h. No entanto, às 12h, houve um aumento estatisticamente significativo do fosfato sérico, apenas no grupo Pan 3% (Figura 3A). Além disso, a análise de ambos os grupos de PA combinados mostrou uma correlação estatisticamente significativa entre o fosfato sérico em 12h e a gravidade da PA (r = 0,61) (Figura 3B). Não houve correlação estatisticamente significativa nos grupos sepse e sham (dados não mostrados).

Sistema purinérgico

A concentração de ATP no soro ficou abaixo do limite de detecção do método em todos os grupos. Os níveis de ADP, AMP, ADO e AU não foram diferentes entre os grupos, nos tempos 0h e 3h. No tempo 12h, houve um aumento estatisticamente significativo nos níveis séricos de purinas apenas no grupo Pan 3% (Figura 4). Para determinar se o aumento do fosfato sérico se correlacionou com a hidrólise de nucleotídeos, analisamos os grupos Pan 3% e Pan 1,5% juntos, no tempo 12h, e encontramos uma correlação estatisticamente significativa entre o fosfato sérico e ADO, com r = 0,84 (Figura 5). No grupo Pan 3% isoladamente, esta correlação estatisticamente significativa foi ainda mais forte, com r = 0,91 (dados não mostrados).

Alterações sistêmicas versus locais

Considerando-se que o aumento das purinas e fosfato foram detectados especificamente na PA grave, nós pesquisamos se estes resultados se originaram a partir

de alterações locais do pâncreas ou refletem uma reação sistêmica. Usando RT-qPCR em tecido pancreático, determinamos a expressão da 5'-nucleotidase (CD73), que é diretamente responsável pela produção da ADO. Além disso, determinamos a expressão do receptor A2a de ADO no pâncreas. No entanto, tanto a expressão da CD73 como do A2a no pâncreas não foi diferente entre os grupos (Figura 6), indicando um possível mecanismo extracelular sistêmico.

Optamos então por incubar as amostras de soro do tempo12h com uma solução 0,1 mM de AMP e medimos os níveis de ADO após 10 minutos, como uma medida indireta da conversão de AMP em ADO pela 5'-nucleotidase. Como foi adicionado substrato no meio de incubação, era esperado que houvesse aumento de ADO em todos os grupos, após 10 min. No entanto, a variação (delta ADO) foi significativamente maior nos grupos Pan 3% e Pan 1,5%, em comparação com os outros grupos, sugerindo um aumento da atividade da 5'-nucleotidase na PA. O delta ADO não apresentou diferença estatística entre os grupos de PA e nem entre o grupo sepse e sham (Figura 7).

Discussão

Utilizando um modelo animal de PA, foi demonstrado neste estudo, pela primeira vez, que os níveis de fosfato sérico aumentam na PA grave e correlacionam-se com a gravidade. Na tentativa de determinar a fonte do fosfato, demonstramos que PA grave leva a um aumento dos níveis séricos de ADP, AMP e ADO. Além disso, foi demonstrado experimentalmente que a hidrólise de AMP em soro estava acelerada nos grupos de PA. Como a hidrólise de nucleotídeos extracelulares libera fosfato, é razoável propor que a degradação de nucleotídeos extracelulares pode ser responsável pelo

aumento do fosfato. Corroborando esta hipótese, encontramos uma forte correlação positiva entre os níveis de ADO e fosfato séricos nos grupos de PA.

A PA grave está associada à SIRS secundária à inflamação estéril (20), com danos locais e a liberação sistêmica de citoquinas pró-inflamatórias, resultando em aumento da permeabilidade vascular, trombose, hemorragia, isquemia pancreática seletiva e injúria por isquemia-reperfusão (21). Estas alterações são inespecíficas e comuns a outras condições inflamatórias. Para controlar esta variável, comparamos os resultados da PA experimental com um modelo experimental de sepse abdominal grave. Ambos os grupos apresentaram aumento séricos de TNF-a, confirmando um estado inflamatório sistêmico, mas as alterações no fosfato sérico e purinas ocorreram apenas nos grupos com PA. Além disso, a hidrólise de AMP no soro foi maior nos grupos de PA, provavelmente representando uma degradação acelerada de purinas extracelulares. Apesar destas alterações terem sido observadas apenas nos grupos de PA, a expressão da CD73 e do receptor A2a de ADO em tecido pancreático não foi afetada, sugerindo que os nossos resultados são parte de uma resposta sistêmica extracelular, que favorece a produção de ADO.

Estudos *in vivo* e *in vitro* têm descrito um papel crítico da ADO extracelular em proteger os tecidos contra danos inflamatórios e isquêmicos (22). Semelhante à PA, a DII envolve alterações microvasculares, trombose e hipóxia grave da mucosa inflamada (23). Estudos experimentais indicam que a produção ADO está aumentada na DII, e a ativação do receptor de ADO promove ações anti-inflamatórias (5), com implicações terapêuticas farmacológicas (7). Em sintonia com os nossos achados, um estudo realizado por Celinski K, et al. (11), com ratos submetidos a PA por infusão retrógrada de taurocolato de sódio a 5%, mostrou que a expressão dos receptores A2a, avaliada por imuno-histoquímica, não foi alterada. No entanto, a administração de CGS

21680, um agonista do receptor A2a, resultou numa diminuição da infiltração de células inflamatórias, alterações hemorrágicas, necrose e a vacuolização das células acinares do pâncreas. Em nosso estudo, demonstramos que a PA grave aumentou os níveis séricos de ADO, provavelmente como uma resposta endógena protetora. Este mecanismo deve ser considerado em estudos como um possível alvo terapêutico.

Uma revisão sistemática recente de 184 estudos em humanos relativos a novos marcadores prognósticos para PA demonstrou que, apesar da profusão de estudos nesta área, quase nenhum dos novos marcadores foi adotado para uso clinico (1). Embora nossos resultados não possam ser transportados diretamente para um contexto clínico, o modelo experimental de infusão retrógrada de taurocolato de sódio é um modelo apropriado para se estudar marcadores de gravidade na PA, porque gera inflamação local e sistêmica, e a gravidade da PA pode ser modulada alterando-se a concentração da solução (24). Além disso, a gravidade PA foi determinada pela histologia, permitindo uma comparação dos níveis séricos de fosfato com uma escala numérica de gravidade. Isto é experimentalmente útil, mas não é viável na prática clínica, onde a gravidade é avaliada por uma combinação de dados de laboratório, imagem e avaliação clínica (25). Apesar destas limitações, nós apresentamos um potencial marcador de gravidade para PA, de baixo custo, e pode ser utilizado facilmente na prática clínica. Este trabalho proporciona evidências científicas concretas que estimulam a realização de outros estudos endereçados ao potencial do sistema purinérgico na PA, e incentiva a aplicação clínica destes achados.

Em conclusão, nosso estudo identifica o fosfato sérico como um possível marcador de gravidade na PA. Além disso, nosso trabalho implica o sistema purinérgico extracelular na resposta sistêmica secundária à PA grave e sugere a ADO e seus receptores como alvos para futuros estudos com terapias farmacológicas para PA grave.

Referências

1. Sigounas DE, Tatsioni A, Christodoulou DK, et al. New prognostic markers for outcome of acute pancreatitis: overview of reporting in 184 studies. Pancreas 2011; 40:522-32.

2. Aoun E, Chen J, Reighard D, et al. Diagnostic accuracy of interleukin-6 and interleukin-8 in predicting severe acute pancreatitis: a meta-analysis. Pancreatology 2009; 9:777-85.

3. Papachristou GI, Whitcomb DC. Inflammatory markers of disease severity in acute pancreatitis. Clin Lab Med 2005; 25:17-37.

4. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. Science 2010; 330:362-6

5. NaganumaM, Wiznerowicz EB, Lappas CM, et al. Cutting edge: critical role for A2A adenosine receptors in the T cell-mediated regulation of colitis. J Immunol 2006; 177:2765–2769

6. Gordon JL. Extracellular ATP: effects, sources and fate. Biochem J 1986; 233:309-19.

7. Eltzschig HK, Sitkovsky MV, Robson SC. Purinergic signaling during inflammation. N Engl J Med 2012; 367:2322-33.

8. Kannan S. E-NTPase/NTPDase: potential role as a regulatory element in inflammation. Med Hypotheses 2002; 58:527-8.

9. Longhi MS, Robson SC, Bernstein SH, et al. Biological functions of ecto-enzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. J Mol Med (Berl) 2013; 91:165-72.

10. Csoka B, Nemeth ZH, Rosenberger P, et al. A2B adenosine receptors protect against sepsis-induced mortality by dampening excessive inflammation. J Immunol 2010; 185:542–550.

11. Celiński K, Prozorow-Król B, Korolczuk A, et al. The role of adenosine A2a receptors in experimental acute pancreatitis. Adv Med Sci 2006; 51:105-10.

12. Prozorow-Krol B, Korolczuk A, Czechowska G, et al. The effects of the adenosine A3 receptor agonist IB-MECA on sodium taurocholate-induced experimental acute pancreatitis. Arch Pharm Res Forthcoming 2013; 27.

13. Birkenfeld AL, Gollasch M, Göbel U, et al. The phosphorus connection-a puzzling business. Nephrol Dial Transplant 2004; 19:1643-5.

14. Wittel UA, Wiech T, Chakraborty S, et al. Taurocholate-induced pancreatitis: a model of severe necrotizing pancreatitis in mice. Pancreas 2008; 36:9-21.

15. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. Nat Protoc 2009; 4:31-6.

16. Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. Ann Surg 1992; 215:44-56.

17. Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca2+ -stimulated ATPase activity. Anal Biochem 1986; 157:375-80.

18. Böhmer AE, Brum LM, Souza DG, et al. Chronic treatment with cyclosporine affects systemic purinergic parameters, homocysteine levels and vascular disturbances in rats. Chem Biol Interact 2010; 188:15-20

19. Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G. Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue. Synapse 2008; 62:302-9.

20. Hoque R, Malik AF, Gorelick F, et al. Sterile inflammatory response in acute pancreatitis. Pancreas 2012; 41:353-7

21. Elfar M, Gaber LW, Sabek O, et al. The inflammatory cascade in acute pancreatitis: relevance to clinical disease. Surg Clin North Am 2007; 87:1325-40.

22. Sitkovsky MV, Lukashev D, Apasov S, et al. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. Annu Rev Immunol 2004; 22:657-82.

23. Karhausen J, Furuta GT, Tomaszewski JE, et al. Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. J Clin Invest 2004; 114:1098-106.

24. Saluja AK, Dudeja V. Relevance of animal models of pancreatic cancer and pancreatitis to human disease. Gastroenterology 2013; 144:1194-8.

25. Wu BU, Banks PA. Clinical management of patients with acute pancreatitis. Gastroenterology 2013; 144:1272-81.

Tabela 1

As sequências dos *primers* para os ensaios de RT-qPCR incluídos no estudo

Sequencia	Senso	Antisenso
Gapd†	5'-TCACCACCATGGAGAAGGC-3'	5'-GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA-3'
Rpl13 α †	5'-ACAAGAAAAAGCGGATGGTG-3'	5'-TTCCGGTAATGGATCTTTGC-3'
Hprt1†	5'-GCAGACTTTGCTTTCCTTGG-3'	5'-CGAGAGGTCCTTTTCACCAG-3'
cd73‡	5'-GGCCAGTCCACAGGGGAGTTCC-3'	5'-TTGACCAGATAGCTTGGGAGGACC-3'
A2a‡	5'-GGGCATCATTGCAATTTGCTGGGTG-3'	5'- TGTAATTCATGGGCACCACGTCCTCG - 3'

† De acordo com Bonefeld BE, et al. (19)

‡ Desenhados pelos autores

Legendas das figuras

Figura 1. O painel mostra as alterações histológicas básicas encontradas no pâncreas (lâminas coradas com hematoxilina e eosina). (A) pâncreas de aparência normal, do grupo sham, sem edema ou infiltração inflamatória. (B) PA leve, com edema difuso e infiltração inflamatória mínima. (C) PA grave, com extensa necrose, hemorragia e infiltrado inflamatório. (D) Pâncreas do grupo sepse, com aparência glandular normal e peritonite. A seta indica a infiltração inflamatória peritoneal.

Figura 2. (A) Gravidade da PA determinada por histologia, apresentada como mediana ± intervalo de mínimo a máximo (os pontos representam os animais individualmente). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de PA. (B) A amilase sérica foi igualmente maior nos grupos Pan 3% e Pan 1,5% em 3h e 12h, mas não houve diferença entre os grupos de PA. * $P < 0,05$. (C) Níveis séricos de TNF-a aumentaram em todos os grupos após 12h em comparação com 0h e foram significativamente diferentes entre todos os grupos em 12h. * $P < 0,05$.

Figura 3. (A) Aumento estatisticamente significativo do fosfato sérico em 12h no grupo Pan 3%. * P <0,05. (B) Correlação entre o fosfato sérico em 12 horas e gravidade da PA analisando os grupos Pan 1,5% e Pan 3% juntos. Coeficiente de Spearman, r = 0,61, P < 0,05.

Figura 4. (A a D) Aumento estatisticamente significativo dos níveis séricos de ADP, AMP, ADO e AU em 12 h somente no grupo Pan 3%. * P < 0,05.

Figura 5. Correlação entre ADO e fosfato séricos, em 12h, analisando-se os grupos Pan 1,5% e Pan 3% juntos. Coeficiente de Spearman, r = 0,84, $P < 0,05$.

Figura 6. Análise do tecido pancreático por RT-qPCR em 12h. (A) Não houve diferença estatística na expressão relativa do RNA da CD73 entre os grupos. (B) Não houve diferença estatística na expressão relativa do RNA do receptor A2a entre os grupos.

Figura 7. Níveis de ADO medidos em 0 minutos e 10 minutos após a incubação do soro do tempo 12h com AMP 0,1 mM. A conversão de AMP em ADO (delta ADO) foi significativamente maior nos grupos Pan de 3% e Pan 1,5%, mas não foi diferente entre os dois grupos.

Artigo em inglês

No formato aceito pela revista *Pancreas*

High phosphate serum levels correlate with the severity of experimental severe acute pancreatitis – insight into the purinergic system

Guilherme S. Mazzini[1,2*], MD; Daniel T. Jost[2]; Denise B. Ramos, MS[2]; Jean P. Oses, PhD[3]; Mateus A. Zeni[1]; Rafael Machoseki[2]; Luiza W. Kist[4,5], PhD; Mauricio R. Boggo[4,5], PhD; Carla D. Bonnan[6,5], PhD; Maria I. Edelweiss, MD, PhD[1]; Marta M. Duarte[7], PhD; Luis V. Portela[2], PhD;; Diogo O. Souza[2], MD, PhD; Alessandro B. Osvaldt[1,8], MD, PhD.

1 Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

2 Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

3 Laboratório de Neurociências Clínicas, ICBS, Centro de Ciências Da Vida E Da Saúde, Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

4 Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

5 Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), Porto Alegre, RS, Brazil.

6 Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

7 Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil.

8 Serviço de Cirurgia Digestiva do Hospital de Clinicas de Porto Aelgre, Porto Alegre, RS, Brasil

The authors declare that there are no potential conflicts of interest to disclose, and would like to thank the financial support of Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos - FIPE/HCPA, INCT-EN/CNPQ, IBN Net, FAPERGS and CAPES.

Running title: Phosphate and purines in acute pancreatitis.

*** Corresponding author:**

Guilherme S. Mazzini, M.D.

Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600 anexo, 90035-000, Porto Alegre, RS, Brazil

e-mail: guimazzini@gmail.com

Phone: +55 51 81364873; Fax: +55 51 33085540

Abstract

Objectives: Extracellular purines are a component of the systemic inflammatory response, and their levels are modulated by ectonucleotidases. Additionally, nucleotide hydrolysis releases phosphate. We studied serum phosphate levels as a predictor of severity in acute pancreatitis (AP) and their correlation with extracellular purinergic metabolism.

Methods: AP was induced by the retrograde injection of sodium taurocholate. The AP group was compared with animals submitted to a model of sepsis by cecal ligation and puncture. The sham group was submitted to laparotomy and closure. We measured the phosphate and purine levels in serum and the expression of 5'- nucleotidase (CD73) and the adenosine A2a receptor in pancreatic tissue by RT-qPCR.

Results: Serum phosphate levels were higher in severe AP and correlated with severity. Severe AP led to increased serum levels of ADP, AMP and adenosine. Additionally, AMP conversion to adenosine in serum was accelerated in the AP groups. We found a positive correlation between serum adenosine and phosphate in the AP groups. The expression levels of CD73 and the adenosine A2a receptor in the pancreas were not altered.

Conclusions: Our study suggests that serum phosphate correlates with severity in AP and implicates extracellular purines in the systemic response to severe AP.

Keywords: acute pancreatitis, necrotizing pancreatitis; purine nucleotides; phosphate, experimental model pancreatitis.

Introduction

Predicting the severity of acute pancreatitis (AP) early in the course of the disease remains a challenge to clinicians and researchers (1). Because systemic inflammatory response syndrome (SIRS) is one of the main causes of morbidity in severe AP, several studies have investigated inflammatory markers as potential predictors of severity (2,3). However, although the purinergic system is a well-described component of the systemic inflammatory response and signaling pathway in disorders such as ischemia-reperfusion injury and inflammatory bowel disease (IBD) (4,5), extracellular purines have not been examined as potential peripheral markers of severity in AP.

The purine nucleotides adenosine triphosphate (ATP) and adenosine diphosphate (ADP) are released from the endothelium, neutrophils, platelets and necrotic and apoptotic cells under acute pathological conditions such as ischemia, hypoxia and inflammation, acting as extracellular signaling molecules (6). In the extracellular space, ATP and ADP are degraded to adenosine monophosphate (AMP), which in turn is degraded to adenosine (ADO), sequentially releasing one phosphate after each conversion. Enzymes called ectonucleotidases regulate this process (6). ATP and ADP are both converted to AMP by the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (CD39). Subsequently, the 5'-nucleotidase (CD73) rapidly converts extracellular AMP to ADO, which exerts its functions by binding to extracellular receptors (A1, A2a, A2b, A3) (7).

As a result of this well-coordinated enzymatic process, ectonucleotidases contribute to the modulation of the inflammatory response and control the extracellular levels of purines (8). An increase in extracellular ADO production has been described as a physiologic anti-inflammatory mechanism secondary to systemic inflammation (9).

This has been demonstrated in experimental sepsis and colitis, for example, with ADO promoting tissue-protective responses (10, 5). Specifically regarding AP, two studies using rats demonstrated the modulation of AP severity via ADO receptors. Using an experimental model of AP, the authors described the attenuation of the histologic inflammatory findings in the pancreas after administration of an agonist of the A2a ADO receptor (11). A similar effect was described using an agonist of the A3 ADO receptor (12).

Considering the possible relationship between extracellular purines and AP, our group hypothesized that extracellular purinergic metabolism is accelerated in AP and is correlated with severity. Additionally, serum phosphate may be increased due to nucleotide hydrolysis by ectonucleotidases. In support of this hypothesis, a case report from Birkenfeld AL, et al., described a patient with an inexplicable hyperphosphatemia, and the computed tomography revealed severe necrotizing acute pancreatitis (13). The authors could not explain what they called “a puzzling business”.

In the present study, we examined the role of serum phosphate levels as a predictor of AP severity using a sodium taurocholate-induced rat experimental model of AP. Additionally, we correlated phosphate alterations with extracellular purinergic metabolism. To exclude the influence of a nonspecific systemic inflammatory response and to isolate the effect of AP, we compared results from rats submitted to AP with those of rats submitted to an experimental model of abdominal sepsis.

Materials and Methods

Animals and surgery

Male Wistar rats (100 to 120 days old, weighing 300-350 g) were obtained from our breeding stock and maintained on a 12 h-light 12 h-dark cycle in a constant

room temperature (22ºC) colony room. Water and a 20% (W/W) protein commercial chow diet were provided *ad libitum*. All animal research protocols and care conditions were approved by the local Institutional Animal Care and Use Committee and were in accordance with the National Guidelines on Animal Care. Surgical procedures were performed after the animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine and xylazine. Acute pancreatitis was induced by a retrograde injection of sodium taurocholate solution into the biliary-pancreatic duct (14). The acute pancreatitis group was divided into two sub-groups – the Pan 3% and Pan 1.5% groups – injected with different concentrations of sodium taurocholate (3% and 1.5%, respectively), leading to different grades of severity (the 3% group should be of greater severity than the 1.5% group). The sepsis group was submitted to an experimental model of abdominal high-grade sepsis by cecal ligation and puncture (15), involving ligation of 75% of the cecum and 2 punctures with an 18 G needle. The sham-operated group was submitted to anesthesia, laparotomy and closure.

Blood was collected from the tail before surgery (time 0 h) and at 3 h. At 12 h, the animals were anesthetized, blood was collected by cardiac puncture, the pancreas was excised, and the rats were euthanized. A portion of the pancreas was placed in Trizol™ reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) for gene expression analysis, and the rest of the tissue was fixed in 10% buffered formalin solution for histologic analysis. Blood samples were centrifuged, and serum was maintained at -70ºC for later analysis.

A diagnosis of AP was made when the serum amylase concentration was 3 times higher than the basal level. Animals submitted to taurocholate injection with no increase in serum amylase were excluded.

Severity of pancreatitis

Hematoxylin and eosin-stained pancreatic slices from all the groups were randomly numbered and examined by a blinded pathologist. Pancreatitis severity was determined using a scale adapted from Schimidt J, et al., (16), and 7 features were scored from 0-4 (total range 0-28): edema, acinar necrosis, fat necrosis, parenchymal hemorrhage, fat hemorrhage, intralobular inflammation and perivascular inflammation.

Biochemical assays

Serum phosphate was determined using a colorimetric assay with malachite green, as described by Chan KM, et al. (17). Serum tumor necrosis factor alpha (TNF-a) was determined with the commercial ELISA Ready-SET-Go!® kit (Ebioscience). Serum calcium was determined by a colorimetric assay using the Cálcio Arsenazo III (Katal Biotecnológica) kit. Amylase serum levels were determined by a colorimetric assay with the Amilase kit (Labtest).

Serum purines

Purine concentrations in deproteinized serum were determined by high performance liquid chromatography (HPLC), according to Böhmer et al. (18). The following purines were evaluated: ATP, ADP, AMP, ADO and UA. Analyses were performed with a Shimadzu Class-VP chromatography system, consisting of a quaternary gradient pump with vacuum degassing and piston desalting modules, a Shimadzu SIL-10AF auto injector valve with a 50 µL loop and a UV detector. Separations were achieved on a Supelcosil^{TM} LC-18, 5 µm – 250 mm x 4.6 mm column (Supelco, St Louis, MO, USA). The mobile phase flowed at a rate of 1.2 mL/min, and the column temperature was 24°C. The buffer composition remained unchanged (A:

150 mmol/L phosphate buffer, pH 6.0, containing 150 mmol/L potassium chloride; B: 15% acetonitrile in buffer A). The gradient profile was modified to the following composition of buffer B in the mobile phase: 0% at 0.00 min, 2% at 0.05 min, 7% at 2.45 min, 50% at 10.00 min, 100% at 11.00 min, and 0% at 12.40 min. Fifty-microliter samples were injected into the injection valve loop. The absorbance was read at 254 nm.

5'-nucleotidase activity in serum

Ten microliters of serum from all the groups at the 12 h time-point were incubated with 130 µL of 205 mM Tris-HCl buffer solution at 37 °C for 10 min. The reaction was initiated by the addition of 60 µL of 0.1 mM AMP solution (final volume for each sample was 200 µL). Immediately after adding AMP, 100 µL of the solution was collected, and the reaction was stopped with 14% Trifluoroacetic acid (TFA) (time 0). The remaining solution was incubated for 10 min at 37°C, and the reaction was stopped with 14% TFA (time 10). Samples were centrifuged, and the supernatant was kept at -70°C until analysis by HPLC, as described above.

Gene expression analysis

Gene expression was determined by quantitative real time polymerase chain reaction (RT-qPCR). Total RNA was isolated with Trizol™ in accordance with the manufacturer's instructions. The total RNA was quantified by spectrophotometry, and the cDNA was synthesized with the ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) from 1 µg of total RNA, following the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed using SYBR™ Green I (Invitrogen) to detect double-stranded cDNA synthesis. Reactions were performed in a volume of 25 µL using 12.5 µL of diluted cDNA (1:50 for *Gapd*, *Rlp13α*, *Hprt1, cd73* and *A2a*), containing a final

concentration of 5 M betaine (Sigma-Aldrich), 0.2 x SYBR™ Green I (Invitrogen), 100 μM dNTP, 1 x PCR Buffer, 3 mM $MgCl_2$, 0.25 U Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and 200 nM of each reverse and forward primer (Table 1). The PCR cycling conditions were as follows: an initial polymerase activation step for 5 min at 95°C, 40 cycles of 15 s at 95ºC for denaturation, 35 s at 60 °C for annealing and 15 s at 72°C for elongation. At the end of the cycling protocol, a melting-curve analysis was included, and the fluorescence was measured from 60 to 99 °C. The relative expression levels were determined with the 7500 Fast Real-Time System Sequence Detection Software v.2.0.5 (Applied Biosystems). The efficiency per sample was calculated using LinRegPCR 11.0 Software (http://LinRegPCR.nl), and the stability of the references genes, *Gapd*, *Rlp13α* and *Hprt1* (*M-value)*, and the optimal number of reference genes according to the pairwise variation (*V*) were analyzed by GeNorm 3.5 Software (http://medgen.ugent.be/genorm/). Relative RNA expression levels were determined using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS for Windows 18 (IBM corporation). The results are expressed as the means ± SD. After the Shapiro-Wilk test, the results were analyzed by the generalized estimating equation (GEE), followed by Bonferroni's post hoc test. 5'-nucleotidase activity in serum was analyzed with the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-hoc test. Correlations were made using Spearman's coefficient. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Basic pancreatic histologic findings are summarized in Figure 1. Serum amylase reached the diagnostic levels of AP in all but 1 animal submitted to taurocholate infusion, which was then excluded. A statistically significant increase at 3 h and 12 h occurred only in the Pan 3% and Pan 1.5% groups and was not different between the AP groups (Figure 2A). The severity scale was altered only in the AP groups but was not significantly different between the AP groups. However, there were predominantly less severe animals in the Pan 1.5% group and predominantly more severe animals in the Pan 3% group, expanding the range of severity in our experiment (Figure 2B). To demonstrate that both experimental models resulted in systemic inflammation, we measured the TNF-a serum levels. There was a significant increase in all groups at 12 h compared with time 0 h, reflecting a systemic inflammatory status due to AP, sepsis or surgery. Additionally, serum TNF-a was significantly different among all the groups at 12 h, with the highest levels in the Pan 3% group, followed by the Pan 1.5% group, the sepsis group and the lowest levels in the sham group (Figure 2C). Calcium serum levels did not show statistically significant differences among the groups (data no shown).

Serum phosphate and severity of AP

Serum phosphate levels were not different among the groups at times 0 h and 3 h. However, at 12 h there was a statistically significant increase in serum phosphate only in the Pan 3% group (Figure 3A). Furthermore, the analysis of both AP groups combined showed a statistically significant correlation between serum phosphate at 12 h and AP severity (r=0.61) (Figure 3B). There was no statistical correlation in the sepsis or sham group (data not shown).

Purinergic system

The ATP concentration in serum was under the detection limit of our method in all groups. ADP, AMP, ADO and UA levels were not different among the groups at times 0 h and 3 h. At 12 h, there was a statistically significant increase in purine serum levels only in the Pan 3% group (Figure 4). To determine whether serum phosphate is increased due to release from nucleotide hydrolysis, we analyzed the Pan 3% and Pan 1.5% groups together at 12 h and found a statistically significant correlation between serum phosphate and ADO, with r=0.84 (Figure 5). In the Pan 3% group, this statistically significant correlation was even higher, with r=0.91 (data not shown).

Systemic vs. local pancreatic alterations

Considering that increased purines and phosphate were detected specifically in severe AP, we determined if these results originated from systemic or local pancreatic reactions. Using RT-qPCR in pancreatic tissue, we determined the expression of 5'-nucleotidase (CD73), which is directly responsible for ADO production. Additionally, we determined the expression of the ADO receptor A2a in the pancreas. However, the expression of CD73 or A2a in the pancreas was not different among the groups (Figure 6), indicating a possible systemic extracellular mechanism.

Therefore, we incubated serum samples from time 12 h with 0.1 mM AMP solution and measured ADO formation after 10 min, as an indirect measure of 5'-nucleotidase activity in serum. Because we added substrate to the incubation medium, all the groups were expected to increase serum ADO after 10 min. However, the variation (delta ADO) was significantly higher in the Pan 3% and Pan 1.5% groups compared with the other groups, suggesting increased extracellular enzymatic activity in

AP. Delta ADO was not significantly different between the sepsis and sham groups and between the AP groups (Figure 7).

Discussion

Using an animal model of AP, we demonstrated for the first time that the serum phosphate levels rise in severe AP and correlate with severity. In determining the source of the phosphate, we demonstrated that severe AP led to increased serum levels of ADP, AMP and ADO. Additionally, we demonstrated experimentally that AMP hydrolysis in serum was accelerated in the AP groups. Because nucleotide hydrolysis releases phosphate, it is reasonable to propose that extracellular nucleotide degradation is responsible for our findings. In support of this hypothesis, we found a strong positive correlation between serum ADO and phosphate in the AP groups.

Severe AP is associated with SIRS due to sterile inflammation (20), with local damage and the systemic release of proinflammatory cytokines , resulting in increased vascular permeability, thrombosis, hemorrhage, selective pancreatic ischemia and ischemia–reperfusion injury (21). These alterations are nonspecific and common to other inflammatory conditions. We controlled this variable by comparing our results from experimental AP with an experimental model of high-grade abdominal sepsis. Both groups showed increased serum TNF-a levels, confirming a systemic inflammatory status, but the alterations in serum phosphate and purines occurred only in the AP groups. Additionally, AMP hydrolysis in serum was higher in the AP groups, most likely representing accelerated extracellular purine degradation. Despite the fact that the alterations observed were specific for AP, the expression of two molecular targets in pancreatic tissue were not affected (CD73 and ADO A2a receptor), suggesting

that our findings are part of a systemic extracellular response favoring the production of ADO.

In vivo and *in vitro* studies have described a critical role for extracellular ADO in protecting tissue from inflammatory and ischemic damage (22). Similar to AP, IBD involves microvascular changes, thrombosis and severe hypoxia of the inflamed mucosa (23). Experimental studies indicate that ADO production is increased in IBD, and ADO receptor activation promotes anti-inflammatory actions (5), with pharmacologic therapeutic implications (7). In line with our findings, a study by Celiński K, et al. (11) of rats submitted to AP by retrograde infusion of 5% sodium taurocholate showed that the expression of A2a receptors evaluated by immunohistochemistry was not altered. Nevertheless, the administration of CGS 21680, an A2a receptor agonist, resulted in a favorable decrease of inflammatory cell infiltration, hemorrhagic changes, necrosis and vacuolization of acinar cells in the pancreas. Accordingly, in our study, we demonstrated that severe AP increased serum ADO levels, most likely as an endogenous protective response. This mechanism should be considered in further studies as a possible therapeutic target.

A recent systematic review of 184 studies in humans concerning new prognostic markers for acute pancreatitis reported that, despite the profusion of studies in this area, hardly any new markers have been adopted into routine clinical use (1). Although our experimental findings may not directly translate to the clinical setting, retrograde infusion of sodium taurocholate is an appropriate model to study severity markers because it causes local and systemic inflammation, and AP severity may be modulated by changing the concentration of the solution (24). Additionally, we determined the AP severity by histology, allowing a comparison of serum levels of phosphate with a numeric scale of severity. This is experimentally useful but not

feasible in clinical practice, where severity is assessed by a combination of laboratory, image, and clinical evaluation (25). Despite these limitations, we present here the novel finding of a potential marker of severity that is not expensive and can be used in clinical practice for different purposes. This work should facilitate other studies and encourage clinical applications.

In conclusion, our study identifies serum phosphate as a promising marker of severity in AP. Additionally, our work implicates the extracellular purinergic system in the systemic response to severe AP and suggests that ADO and ADO receptors are putative targets for further studies of pharmacological therapeutics for severe AP.

References

1. Sigounas DE, Tatsioni A, Christodoulou DK, et al. New prognostic markers for outcome of acute pancreatitis: overview of reporting in 184 studies. Pancreas 2011; 40:522-32.

2. Aoun E, Chen J, Reighard D, et al. Diagnostic accuracy of interleukin-6 and interleukin-8 in predicting severe acute pancreatitis: a meta-analysis. Pancreatology 2009; 9:777-85.

3. Papachristou GI, Whitcomb DC. Inflammatory markers of disease severity in acute pancreatitis. Clin Lab Med 2005; 25:17-37.

4. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. Science 2010; 330:362-6

5. NaganumaM, Wiznerowicz EB, Lappas CM, et al. Cutting edge: critical role for A2A adenosine receptors in the T cell-mediated regulation of colitis. J Immunol 2006; 177:2765–2769

6. Gordon JL. Extracellular ATP: effects, sources and fate. Biochem J 1986; 233:309-19.

7. Eltzschig HK, Sitkovsky MV, Robson SC. Purinergic signaling during inflammation. N Engl J Med 2012; 367:2322-33.

8. Kannan S. E-NTPase/NTPDase: potential role as a regulatory element in inflammation. Med Hypotheses 2002; 58:527-8.

9. Longhi MS, Robson SC, Bernstein SH, et al. Biological functions of ecto-enzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. J Mol Med (Berl) 2013; 91:165-72.

10. Csoka B, Nemeth ZH, Rosenberger P, et al. A2B adenosine receptors protect against sepsis-induced mortality by dampening excessive inflammation. J Immunol 2010; 185:542–550.

11. Celiński K, Prozorow-Król B, Korolczuk A, et al. The role of adenosine A2a receptors in experimental acute pancreatitis. Adv Med Sci 2006; 51:105-10.

12. Prozorow-Krol B, Korolczuk A, Czechowska G, et al. The effects of the adenosine A3 receptor agonist IB-MECA on sodium taurocholate-induced experimental acute pancreatitis. Arch Pharm Res Forthcoming 2013; 27.

13. Birkenfeld AL, Gollasch M, Göbel U, et al. The phosphorus connection-a puzzling business. Nephrol Dial Transplant 2004; 19:1643-5.

14. Wittel UA, Wiech T, Chakraborty S, et al. Taurocholate-induced pancreatitis: a model of severe necrotizing pancreatitis in mice. Pancreas 2008; 36:9-21.

15. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. Nat Protoc 2009; 4:31-6.

16. Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. Ann Surg 1992; 215:44-56.

17. Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca2+ -stimulated ATPase activity. Anal Biochem 1986; 157:375-80.

18. Böhmer AE, Brum LM, Souza DG, et al. Chronic treatment with cyclosporine affects systemic purinergic parameters, homocysteine levels and vascular disturbances in rats. Chem Biol Interact 2010; 188:15-20

19. Bonefeld BE, Elfving B, Wegener G. Reference genes for normalization: a study of rat brain tissue. Synapse 2008; 62:302-9.

20. Hoque R, Malik AF, Gorelick F, et al. Sterile inflammatory response in acute pancreatitis. Pancreas 2012; 41:353-7

21. Elfar M, Gaber LW, Sabek O, et al. The inflammatory cascade in acute pancreatitis: relevance to clinical disease. Surg Clin North Am 2007; 87:1325-40.

22. Sitkovsky MV, Lukashev D, Apasov S, et al. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. Annu Rev Immunol 2004; 22:657-82.

23. Karhausen J, Furuta GT, Tomaszewski JE, et al. Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. J Clin Invest 2004; 114:1098-106.

24. Saluja AK, Dudeja V. Relevance of animal models of pancreatic cancer and pancreatitis to human disease. Gastroenterology 2013; 144:1194-8.

25. Wu BU, Banks PA. Clinical management of patients with acute pancreatitis. Gastroenterology 2013; 144:1272-81.

Table 1.

Primer sequences for the RT-qPCR experiments included in the study

Sequence	Sense	Antisense
Gapd†	5'-TCACCACCATGGAGAAGGC-3'	5'-GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA-3'
Rpl13 α †	5'-ACAAGAAAAAGCGGATGGTG-3'	5'-TTCCGGTAATGGATCTTTGC-3'
Hprt1†	5'-GCAGACTTTGCTTTCCTTGG-3'	5'-CGAGAGGTCCTTTTCACCAG-3'
cd73‡	5'-GGCCAGTCCACAGGGGAGTTCC-3'	5'-TTGACCAGATAGCTTGGGAGGACC-3'
A2a‡	5'-GGGCATCATTGCAATTTGCTGGGTG-3'	5'- TGTAATTCATGGGCACCACGTCCTCG -3'

† According to Bonefeld BE, et al. (19)

‡ Designed by the authors

Figure Legends

Figure 1. The panel shows the basic histologic alterations found in the pancreas (hematoxylin and eosin-stained slices). (A) Normal appearing pancreas from the sham group, with no edema or inflammatory infiltration. (B) Mild AP, with diffuse edema and minimum inflammatory infiltration. (C) Severe AP, with extensive necrosis, hemorrhage and inflammatory infiltration. (D) Pancreas from the sepsis group, with normal glandular appearance and peritonitis. The arrow indicates peritoneal inflammatory infiltration.

Figure 2. (A) AP severity accessed by histology is presented as the median ± min to max range (dots represent individual animals). There was no statistically significant difference between the AP groups. (B) Serum amylase was similarly higher in the Pan 3% and Pan 1.5% groups at 3 h and 12 h, but there was no difference between the AP groups. * $P<0.05$. (C) Serum TNF-a increased in all the groups at 12 h compared with 0 h and was significantly different among all the groups at 12 h. * $P<0.05$.

Figure 3. (A) Statistically significant increase in serum phosphate at 12 h in the Pan 3% group. * $P<0.05$. (B) Correlation between serum phosphate at 12 h and AP severity when analyzing the Pan 1.5% and Pan 3% groups together. Spearman coefficient, r=0.61, $P<0.05$.

Figure 4. (A to D) Statistically significant increase in the serum levels of ADP, AMP, ADO and UA at 12 h only in the Pan 3% group. *$P<0.05$.

Figure 5. Correlation between serum ADO and phosphate at 12 h, when analyzing the Pan 1.5% and Pan 3% groups together. Spearman coefficient, r=0.84, $P<0.05$.

Figure 6. RT-qPCR analysis of the pancreas at 12 h. (A) The relative RNA expression of CD73 was not significantly different among the groups. (B) The relative RNA expression of the ADO A2a receptor was not significantly different among the groups.

Figure 7. ADO levels measured at 0 min and 10 min after the incubation of serum from the 12 h time-point with 0.1 mM AMP. Conversion of AMP to ADO (Delta ADO) was significantly higher in the Pan 3% and Pan 1.5% groups but not different between the Pan 3% and Pan 1.5% groups.

FIGURAS

Figura 1

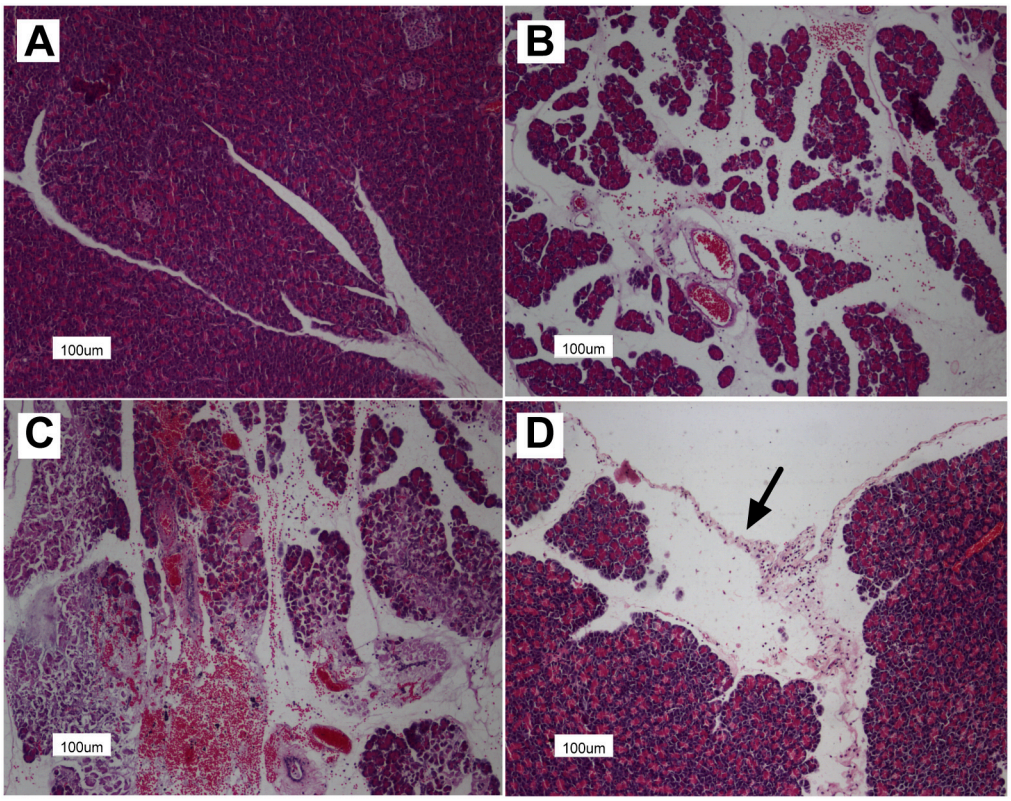


Figura 2

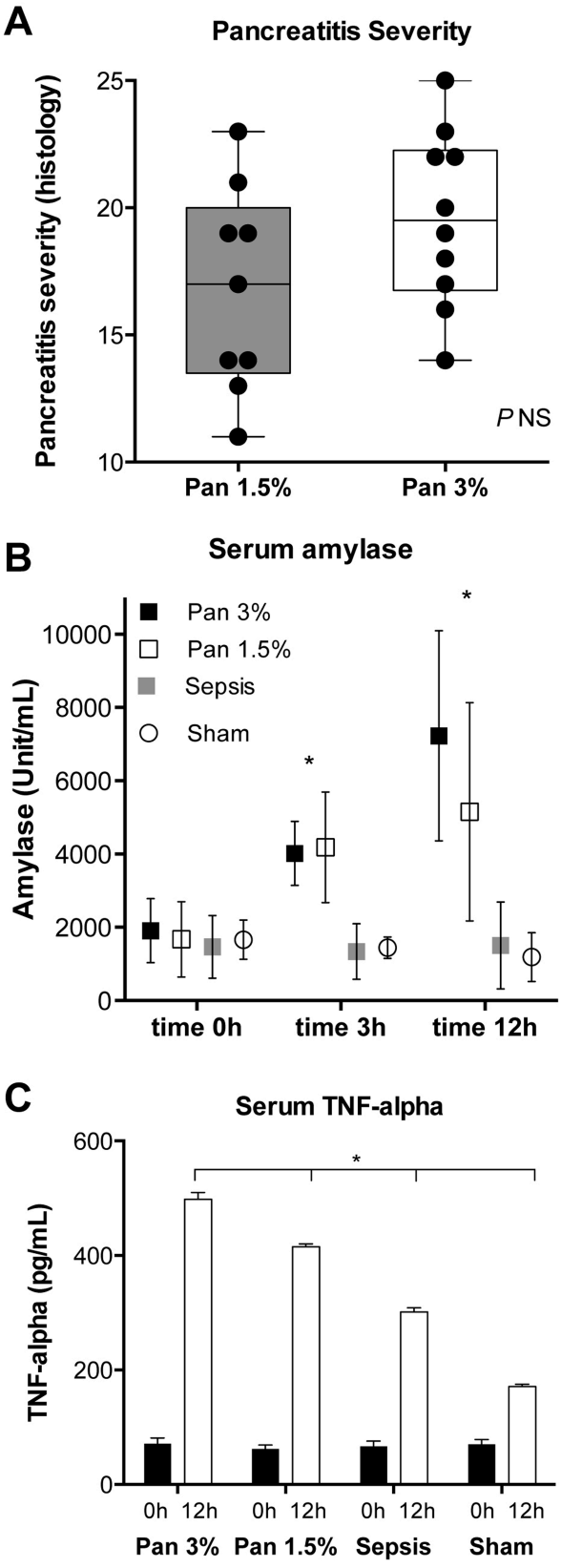

A
Pancreatitis Severity
Pancreatitis severity (histology)
25
20
15
10
P NS
Pan 1.5%
Pan 3%
B
Serum amylase
Pan 3%
Pan 1.5%
Sepsis
Sham
Amylase (Unit/mL)
10000
8000
6000
4000
2000
0
*
*
time 0h
time 3h
time 12h
C
Serum TNF-alpha
TNF-alpha (pg/mL)
600
400
200
0
*
0h 12h 0h 12h 0h 12h 0h 12h
Pan 3% Pan 1.5% Sepsis Sham

Figura 3

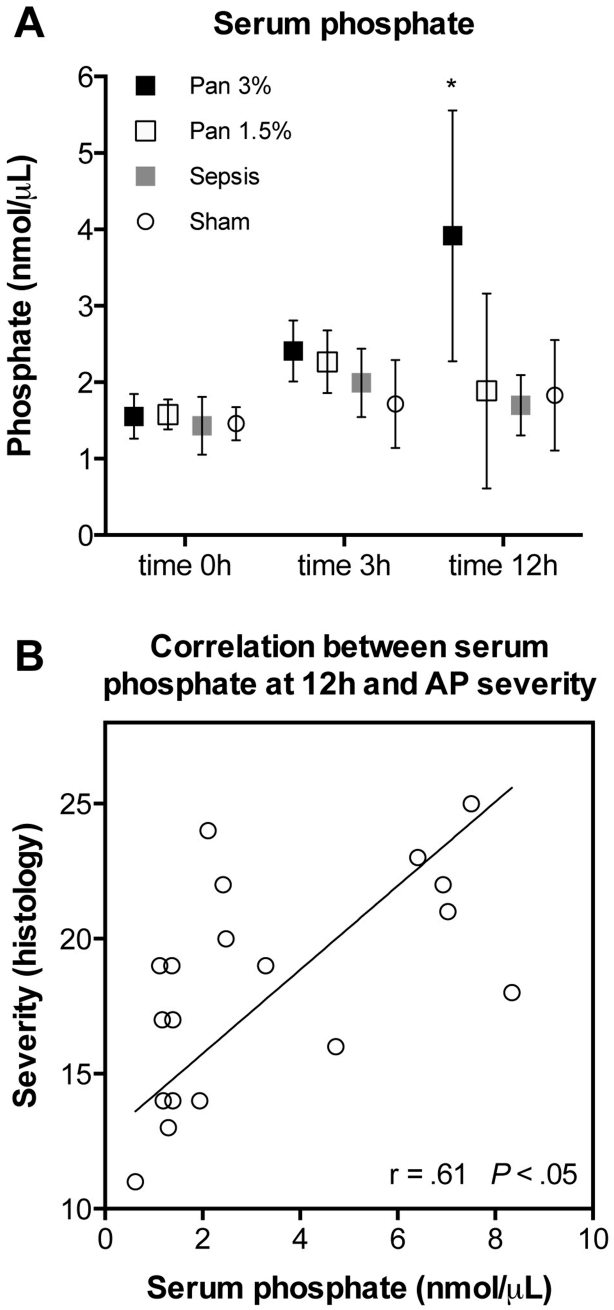

A
Serum phosphate
Pan 3%
Pan 1.5%
Sepsis
Sham
*
Phosphate (nmol/μL)
0
1
2
3
4
5
6
time 0h
time 3h
time 12h
B
Correlation between serum phosphate at 12h and AP severity
Severity (histology)
10
15
20
25
r = .61 P < .05
0
2
4
6
8
10
Serum phosphate (nmol/μL)

Figura 4

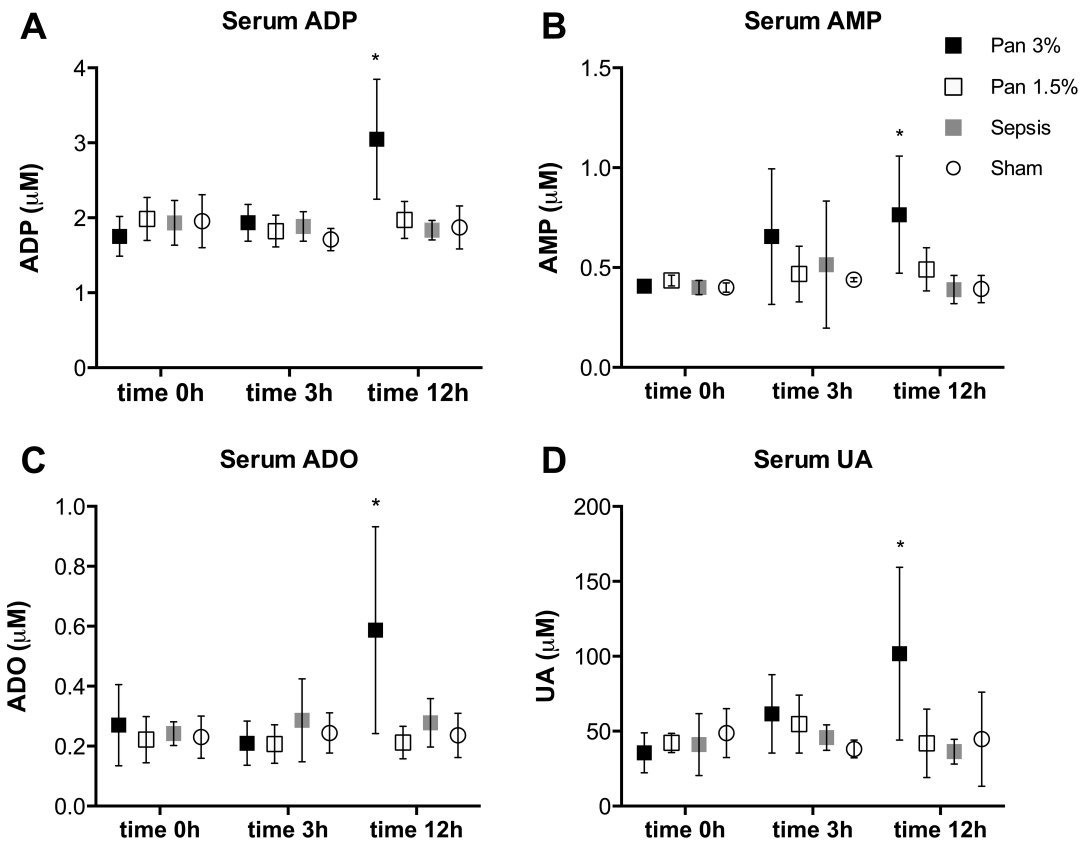

A
Serum ADP
ADP (μM)
4
3
2
1
0
*
time 0h
time 3h
time 12h
B
Serum AMP
AMP (μM)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
time 0h
time 3h
time 12h
Pan 3%
Pan 1.5%
Sepsis
Sham
C
Serum ADO
ADO (μM)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
time 0h
time 3h
time 12h
D
Serum UA
UA (μM)
200
150
100
50
0
*
time 0h
time 3h
time 12h

Figura 5

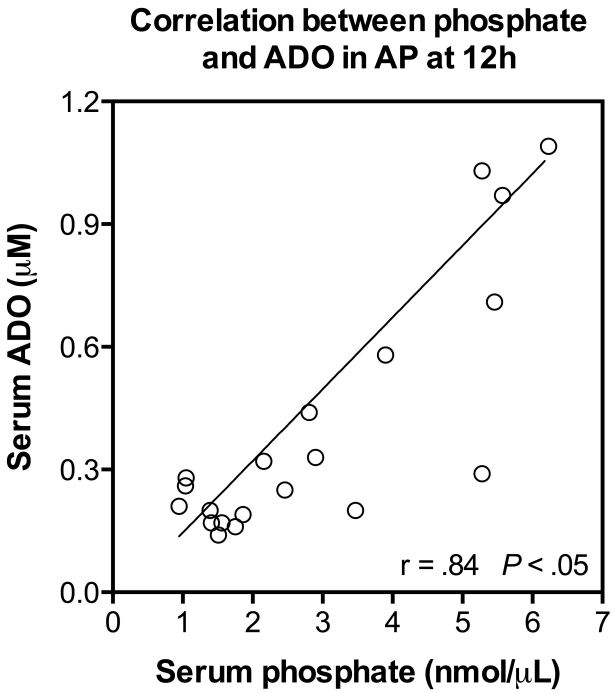

Correlation between phosphate and ADO in AP at 12h
Serum ADO (μM)
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
0
1
2
3
4
5
6
7
r = .84 P < .05
Serum phosphate (nmol/μL)

Figura 6

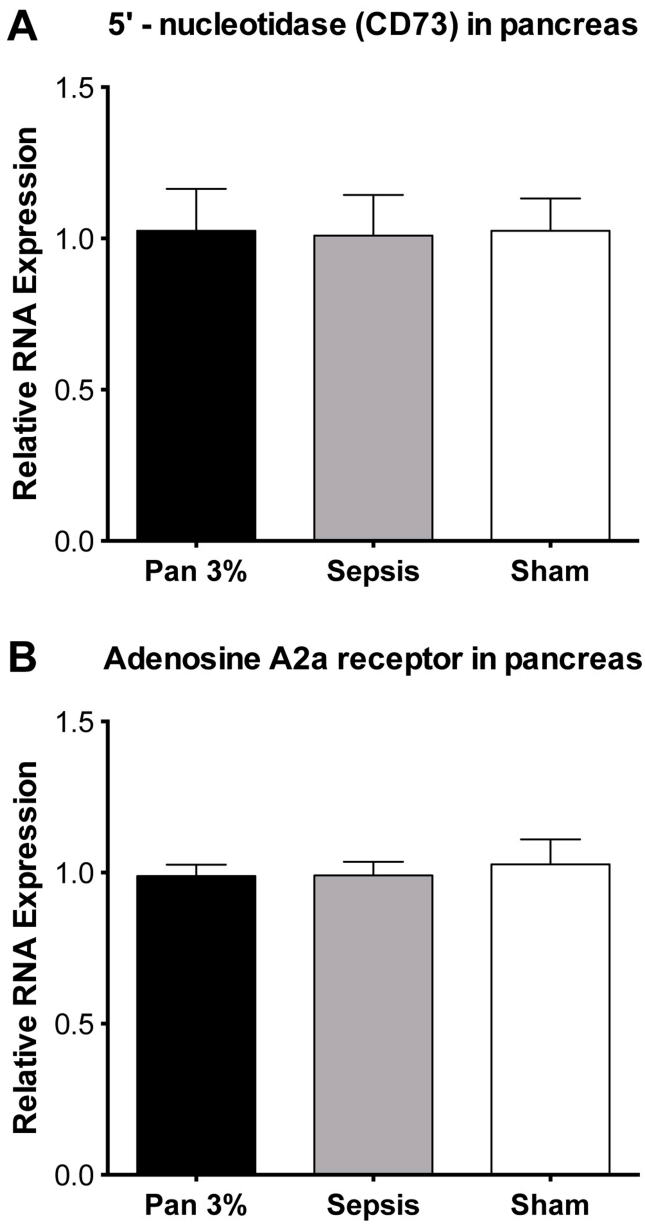
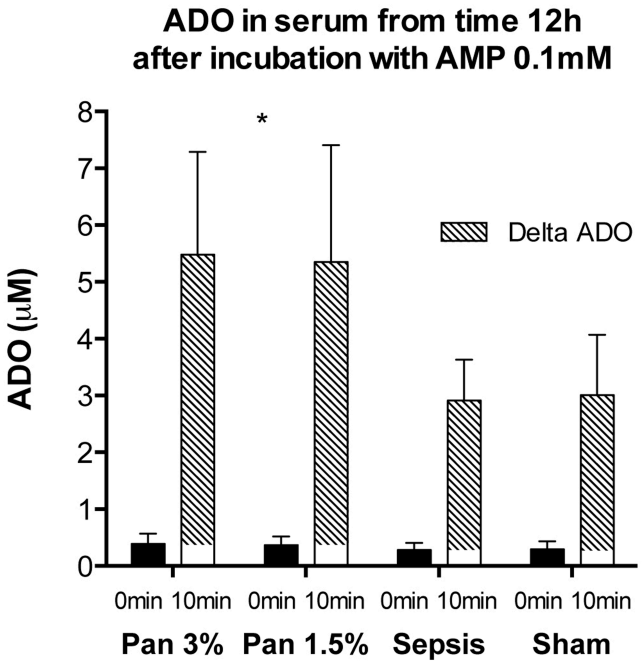

A
5' - nucleotidase (CD73) in pancreas
Relative RNA Expression
1.5
1.0
0.5
0.0
Pan 3%
Sepsis
Sham
B
Adenosine A2a receptor in pancreas
Relative RNA Expression
1.5
1.0
0.5
0.0
Pan 3%
Sepsis
Sham

Figura 7


ADO in serum from time 12h
after incubation with AMP 0.1mM
ADO (μM)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
*
Delta ADO
0min 10min 0min 10min 0min 10min 0min 10min
Pan 3% Pan 1.5% Sepsis Sham

Parte III

Considerações finais e perspectivas

Esta tese traz uma abordagem experimental da PA que possibilitou a avaliação de um possível novo marcador de gravidade e propõe um novo alvo para estudos com foco em terapias farmacológicas. Além disso, estimula que os resultados apresentados sejam avaliados em humanos, transpondo o achado experimental para a prática clínica. Nossos resultados proporcionaram mais perguntas, que merecem ser respondidas com a continuidade das pesquisas. Desta forma, esta tese abre caminho para o desenvolvimento de uma linha de pesquisa com a participação de bolsistas de iniciação científica e com a formação de novos pesquisadores, bem como para enriquecimento dos resultados a partir da interação da pesquisa básica com a pesquisa clínica.

Para isto, nosso grupo pretende dar seguimento às pesquisas com as seguintes proposta:

1 – Dosagem dos níveis de fosfato e purinas séricos em pacientes admitidos com PA no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, correlacionando os achados com os marcadores e escores de gravidade utilizados na prática clínica;

2 – Estudos experimentais avaliando a aplicação farmacológica do possível efeito protetor da conversão extracelular de AMP em ADO;

3 – Estudos experimentais que se aprofundem no mecanismo sistêmico extracelular apresentado neste estudo, e que leva a um aumento na degradação de nucleotídeos extra-celulares como uma provável ação protetora endógena.