



**UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO DE JANEIRO**  
UFRJ

Faculdade de Medicina  
Departamento de Cirurgia  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas

# **Repercussões Encefálicas da Pancreatite Aguda. Estudo experimental em ratos Wistar.**

**TAMIRES CABRAL FRANÇA**

**Rio de Janeiro**

**2022**

**TAMIRES CABRAL FRANÇA**

# **Repercussões Encefálicas da Pancreatite Aguda. Estudo experimental em ratos Wistar.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina (Ciências Cirúrgicas).

Orientadores: Prof. Dr. Wagner Baetas da Cruz

Prof. Dr. José Eduardo Ferreira Manso

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Ferreira da Cruz

**Rio de Janeiro**

**2022**

Cabral-França, Tamires

Repercussões encefálicas da pancreatite aguda. Estudo experimental em ratos Wistar./ Tamires Cabral França .– Rio de Janeiro: UFRJ/ FM, 2022.

xv, 59 f.: il.; 31 cm.

Orientadores: Prof. Dr. Wagner Baetas da cruz

Prof. Dr. José Eduardo Ferreira Manso

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Ferreira Cruz

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ Faculdade de Medicina / Programa de Pós Graduação em Ciências Cirúrgicas

Referências Bibliográficas: f. 6.

1. Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica; 2. Reação Inflamatória Pancreática; 3. Mediadores Inflamatórios; 4. Inflamassoma; 5. Microglia

## TAMIRES CABRAL FRANÇA

Repercussões Encefálicas da Pancreatite Aguda. Estudo experimental em ratos Wistar.

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina (Ciências Cirúrgicas).

Rio de Janeiro, 01 de junho de 2022.

Aprovada por:



---

Prof. Dr. Pedro Moreno Pimentel Coelho



---

Prof. Dr. José Marcus Raso Eulálio



---

Prof. Dr. Wagner Baetas Da Cruz

Rio de janeiro

2022

## Resumo

França, Tamires Cabral. REPERCUSSÕES ENCEFÁLICAS DA PANCREATITE AGUDA. Estudo experimental em ratos Wistar. Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Cirúrgicas, Rio de Janeiro, 2022.

A pancreatite aguda é uma inflamação do pâncreas causando lesão ou destruição dos ácinos pancreáticos. Seu processo inflamatório agudo promove a ativação leucocitária e a liberação de mediadores pró-inflamatórios. Alguns mediadores pró-inflamatórios sistêmicos são responsáveis pelo desencadeamento dos mecanismos básicos envolvidos na reatividade microglial. O objetivo deste estudo foi investigar os possíveis efeitos da pancreatite aguda (PA) sobre a expressão de mediadores inflamatórios no parênquima encefálico e na ativação da microglia do hipocampo. Foram utilizados 16 ratos, da linhagem Wistar do sexo feminino, distribuídos em dois grupos (Sham e PA) sendo 8 ratos para cada grupo. Foi realizada a cirurgia de manipulação do pâncreas no grupo Sham e de ligadura na porção esplênica do pâncreas no grupo PA. Após 48h os animais foram induzidos à morte para coletas dos tecidos (sangue, pâncreas e encéfalo) para análise histopatológica do pâncreas, análise RT-PCR do pâncreas e encéfalo, análise imunohistoquímica do encéfalo e análise sérica da amilase. A análise macroscópica do grupo PA revelou que, após 48 horas de ligadura, os ratos apresentavam edema, esteatonecrose e hemorragia. A análise histopatológica mostrou a presença de infiltrado inflamatório, edema, hemorragia e necrose tecidual no grupo PA, enquanto o grupo Sham mostrou apenas edema e infiltrado inflamatório intersticial. Para confirmar a indução da inflamação pancreática, realizamos a análise da amilase sérica, e os níveis detectados no grupo PA foram significativamente maiores quando comparados ao grupo Sham. Para entender o impacto da resposta inflamatória sistêmica induzida pela pancreatite aguda na homeostase cerebral, avaliamos o perfil das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  por ensaios de qRT-PCR no encéfalo. A expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  foi significativamente maior no grupo PA em comparação com o grupo Sham. Em contraste, os níveis de mRNA de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  foram semelhantes em ambos os grupos. Além disso, estudamos a expressão do inflamassoma NLRP3 em todo o encéfalo e também no pâncreas de ambos os grupos experimentais. Após análise molecular, a expressão de NLRP3 estava significativamente aumentada no pâncreas e encéfalo de ratos do grupo PA em comparação com os do grupo Sham. Nenhuma mudança significativa nos níveis de mRNA de caspase-1 foi observada entre os grupos PA e

Sham no encéfalo. Por outro lado, a expressão de mRNA da caspase-1 foi significativamente maior no tecido pancreático do grupo PA em relação ao grupo Sham. Níveis elevados de mRNA de BDNF foram encontrados no encéfalo de ratos do grupo PA versus os do grupo Sham. Por outro lado, os níveis de mRNA de NGF foram significativamente maiores no grupo Sham em comparação com o grupo PA. Os ensaios de imunohistoquímica mostraram um grande número de células Iba1<sup>+</sup> e PU.1<sup>+</sup> nas regiões CA1, CA3 e giro dentado do hipocampo do grupo PA. Além disso, células Iba1<sup>+</sup> com numerosos prolongamentos densos, compatíveis com microglia ativada, foram detectadas no grupo PA. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a PA tem o potencial de induzir uma inflamação sistêmica capaz de promover alterações morfológicas na microglia, compatíveis com o fenótipo ativado.

Palavras-chave: Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica; Reação Inflamatória Pancreática; Mediadores Inflamatórios; Inflamassoma; Microglia

## ABSTRACT

França, Tamires Cabral. BRAIN REPERCUSSIONS OF ACUTE PANCREATITIS. EXPERIMENTAL STUDY IN WISTAR RATS. Master's thesis submitted to the Graduate Program in Surgical Sciences of the Department of Surgery, School of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro, as part of the requirements for obtaining a Master's degree in Surgical Science, Rio de Janeiro, 2022.

Acute pancreatitis is an inflammation of the pancreatic glandular parenchyma that causes injury with or without destruction of pancreatic acini. Several lines of evidence point to some systemic pro-inflammatory mediators as responsible for triggering the basic mechanisms involved in microglial reactivity. The aim of this study was to investigate the possible repercussions of an acute pancreatitis (AP) on the production of inflammatory mediators in the brain parenchyma and microglial activation in the hippocampus. Macroscopic analysis of pancreatic lesion model using pancreas ligation surgery procedure-induced pancreatitis (AP group) revealed that after 48 hours of surgery, rats presented edema, steatonecrosis and hemorrhage. Histopathological analysis revealed the presence of an inflammatory infiltrate, edema, hemorrhage and tissue necrosis in the AP group. To confirm the induction of pancreatic inflammation, we performed the analysis of serum amylase, and the levels detected in the AP group were significantly higher when compared to the control group. Immunohistochemistry assays showed a large number of Iba1+ and PU.1+ cells in the CA1, CA3, dentate gyrus regions of the hippocampus of the AP group. Moreover, Iba1+ cells with numerous dense processes, compatible with activated microglia, were detected in the AP group. In order to understand the impact of the systemic inflammatory response induced by acute pancreatitis on cerebral homeostasis, we evaluated the profile of the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$  by qRT-PCR assays in the brain. TNF- $\alpha$  mRNA expression was significantly higher in the AP group compared to the control group. In contrast, IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$  mRNA levels were similar in both AP pancreatitis and control groups. In addition, we studied the expression of the NLRP3 inflammasome throughout the brain and also in the pancreas of the two experimental groups. After molecular analysis, NLRP3 expression was found to be significantly increased in the pancreas and brain of rats of the AP group compared to those of the control group. No

significantly change in the caspase-1 mRNA levels was observed in the brain between AP and control groups. On the other hand, mRNA expression of caspase-1 was significantly higher in the pancreatic tissue of AP group compared to the control group. High levels of BDNF mRNA were found in the rats brain of AP group versus those in the control group. On the other hand, NGF mRNA levels were significantly higher in the control group compared to the AP group. Taken together, our results suggest that AP has the potential to induce a systemic inflammation capable of promoting morphological changes in the microglia, compatible with the activated phenotype.

**Key-words:** Systemic Inflammatory Response Syndrome; Pancreatic Inflammatory Reaction; Inflammatory Mediators; Inflammasome; Microglia.



## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Pancreatite Aguda .....	1
1.2 Inflamação Sistêmica e reatividade glial. ....	2
1.3 Inflamassomas (NLRP3, Caspase-1).....	4
1.4 Fatores Neurotróficos: .....	6
1.5 Microglia .....	7
2. JUSTIFICATIVA.....	12
3. OBJETIVO .....	12
4. METODOS .....	12
4.1 Desenho da Evolução temporal: .....	13
4.2 Procedimento Cirúrgico para Indução dos Grupos Experimentais .....	13
4.3 Análise histológica do pâncreas: .....	15
4.4 Procedimento de Expressão Gênica por RT-PCR em tempo real:.....	16
4.6 Procedimentos da Análise Bioquímica (Dosagem sérica da Amilase):.....	18
4.7 Análise Estatística.....	19
5. RESULTADOS.....	19
5.1 Características Clínicas: .....	19
5.2 Características macroscópicas do pâncreas após a indução de PA: .....	19
5.3 Análise Histológica do Pâncreas :.....	21
5.4 Análise da Amilase sérica: .....	24
5.5 Análise do Pâncreas por RT - PCR em Tempo Real: .....	25
5.6 Análise do tecido encefálico Encéfalo por RT-PCR :.....	26
5.7 Análises Imuno-histoquímicas do hipocampo:.....	30
6. DISCUSSÃO: .....	33
7. CONCLUSÃO.....	39
8. REFERÊNCIAS: .....	40
9. ANEXO 1 .....	46

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Impacto da inflamação sistêmica na progressão da neurodegeneração crônica: microglia ativada.....	11
Figura 2 - Evolução temporal PA.....	13
Figura 3 - Esquema da divisão segmentar do pâncreas de ratos e os percentuais relativos de massa de tecido.....	14
Figura 4 - Primers de genes específicos.....	17
Figura 5 - Análise macroscópica do pâncreas.....	20
Figura 6 - Análise macroscópica do modelo de pancreatite aguda induzida por ligadura da porção esplênica do pâncreas de rato.....	20
Figura 7 - Análise macroscópica do modelo de pancreatite aguda induzida por ligadura da porção esplênica do pâncreas de rato.....	21
Figura 8 - Análise histopatológica do tecido pancreático de ratos do grupo Sham.....	22
Figura 9 - Análise histopatológica do tecido pancreático de ratos do grupo PA.....	23
Figura 10 - Nível de amilase sérica 48 horas após pancreatite aguda (PA) induzida por procedimento de ligadura na porção caudal do pâncreas de ratos.....	24
Figura 11 - Análise quantitativa por RT-PCR do mRNA do inflamassoma NLRP3 no pâncreas de ratos com pancreatite aguda (PA) induzida por procedimento de ligadura na porção caudal do pâncreas.....	25
Figura 12 - Análise quantitativa por RT-PCR do mRNA do inflamassoma caspase-1 no pâncreas de ratos com pancreatite aguda (PA) induzida por procedimento de ligadura na porção caudal do pâncreas.....	26
Figura 13 - Análise quantitativa por RT-PCR do mRNA do TNF- $\alpha$ no encéfalo de ratos com pancreatite aguda (PA) induzida por procedimento de ligadura na porção caudal do pâncreas.....	27
Figura 14 - Análise quantitativa por RT-PCR do mRNA do TNF- $\alpha$ no encéfalo de ratos com pancreatite aguda (PA) induzida por procedimento de ligadura na porção caudal do pâncreas.....	27
Figura 15 - Análise quantitativa por RT-PCR do mRNA do caspase-1 no encéfalo de ratos com pancreatite aguda (PA) induzida por procedimento de ligadura na porção caudal do pâncreas.....	28
Figura 16 - Análise quantitativa por RT-PCR do mRNA do inflamassoma NLRP3 no encéfalo de ratos com pancreatite aguda (PA) induzida por procedimento de ligadura na porção caudal do pâncreas.....	28
Figura 17 - Análise quantitativa por RT-PCR de mRNA de NGF no encéfalo de ratos com pancreatite aguda (PA) induzida por procedimento de ligadura na porção caudal do pâncreas.....	29
Figura 18 - Análise quantitativa por RT-PCR de mRNA de BDNF no encéfalo de ratos com pancreatite aguda (PA) induzida por procedimento de ligadura na porção caudal do pâncreas.....	29
Figura 19 - Identificação de células Iba1+ em regiões do hipocampo de ratos com pancreatite aguda (PA) induzida por procedimento de ligadura na porção caudal do pâncreas.....	31

Figura 20 - Identificação de células PU.1+ em regiões do hipocampo de ratos com pancreatite aguda (PA) induzida por procedimento de ligadura na porção caudal do pâncreas.....32

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALS: esclerose lateral amiotrófica

ATP: Adenosine triphosphate (do inglês - adenosina trifosfato)

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro

BHE: Barreira hematoencefália

DA: Doença de Alzheimer

DAPI: Diamino phenyl índole (do inglês – diamino fenil indol)

DP: Doença de Parkinson

DAMPs: Damage-associated molecular pattern (do inglês – padrão molecular associado a dano).

DNA: Deoxyribonucleic acid (do inglês - ácido desoxirribonucléico)

EGF: Epithelial growth factor (do inglês - Fator de crescimento epitelial)

FGF: Fibroblast growth factor (do inglês - Fator de crescimento de fibroblastos)

GD: Giro denteado.

H&E: Hematoxilina e eosina

HMGB1: High mobility group protein B1 (do inglês - proteína B1 do grupo de alta mobilidade)

IFN- $\gamma$ : Interferon-Gama

LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano

MHC class I/II: Major Histocompatibility Complex (MHC) class I and class II (do inglês – Complexo principal de histocompatibilidade classe I e II)

MS: Esclerose múltipla (do inglês – multiple sclerosis)

NGF: Nerve Growth Factor (do inglês - Fator de crescimento de nervo)

NLR: repetição rica em leucina

PA: Pancreatite Aguda

PAMPs: Pathogen-Associated Molecular Pattern (do ingles – padrão molecular associado a patógeno)

PAR2: Proteinase-activated receptor-2

PBS: Phosphate Buffered Saline ( do inglês - solução fosfato tamponada)

PYRIN: pirin (do inglês - pirina amino-terminal)

ROS: Reactive Oxygen Species ( do inglês - Espécies reativas de oxigênio)

RT-PCR real time: Reverse transcription polymerase chain reaction ( do inglês – transcrição reversa seguida em cadeia de polimerase)

SNP: Sistema nervoso periférico

SNC: Sistema nervoso central

SRIS: Síndrome de resposta inflamatória sistêmica

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Pancreatite Aguda

A Pancreatite Aguda (PA) é uma doença complexa causada pela inflamação e autodigestão do parênquima pancreático que pode cursar com ou sem destruição total dos ácinos pancreáticos(1–3). Embora descrita desde 1652 pelo pesquisador Nicholaes Tulp (4), e a despeito das inúmeras pesquisas recentes com modelos experimentais de pancreatite aguda, ainda não estão totalmente esclarecidos: causas e fatores que determinam o desenrolar desta doença. Dentre os numerosos fatores etiológicos que podem desencadear a inflamação do parênquima pancreático, a litíase biliar é o mais frequente (5–8).

A incidência anual da pancreatite aguda varia de 4,9 a 40 casos por 100.000 habitantes por ano (9,10) e a taxa de mortalidade pode chegar a 30%. Esta taxa varia de acordo com a gravidade do quadro clínico. A doença se inicia de forma localizada, branda e autolimitante, podendo evoluir com intensa resposta inflamatória sistêmica (SIRS), originando a forma grave da doença que pode acarretar falência orgânica múltipla com possível óbito do paciente (11). Considerando-se a teoria da autodigestão(12), a pancreatite aguda teria início após obstrução do ducto pancreático e consequente ativação de pro-enzimas pancreáticas inativas. A precoce e inapropriada ativação do tripsinogênio em tripsina desencadeia uma sequência de reações inflamatórias que causarão graves lesões à estrutura das células acinares, além da propagação da inflamação neurogênica. Com a evolução da síndrome inflamatória sistêmica os mediadores inflamatórios (13–15) alcançam a corrente sanguínea e podem afetar vários órgãos distantes do pâncreas como o encefálo. A resposta inflamatória da pancreatite aguda é o resultado do envolvimento de alguns mediadores pró- e anti-inflamatórios que atuam ativando e recrutando células imuno-inflamatórias para o pâncreas. Mais especificamente, os neutrófilos, que liberam enzimas proteolíticas, e os macrófagos, secretando as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ . Ambas as células têm importância capital neste processo, podendo gerar sinais pró-inflamatórios e, também liberar fatores reativos que intensificam a gravidade da lesão pancreática (16). Além dos macrófagos teciduais e dos leucócitos, células imunologicamente ativas do tecido nervoso periférico, por sua

capacidade de gerar a inflamação neurogênica, em resposta à liberação da substância P (17) ou à estimulação pelo PAR2(4), poderiam interferir na mediação destes eventos iniciais da cascata inflamatória da pancreatite aguda (18).

## **1.2 Inflamação Sistêmica e reatividade glial.**

As citocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular produzidas durante o estresse ou lesões celulares, atuando como um meio de comunicação célula-a-célula (19,20). Nesta condição, os leucócitos ativados são a principal fonte de citocinas. A IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  são os membros primários da SIRS e têm papel-chave em quase todas as etapas deste tipo de resposta, atuando desde as fases iniciais até as tardias, levando à amplificação da inflamação. Tanto a IL-1 $\beta$  como o TNF- $\alpha$  são capazes de induzir a sua própria expressão, como também a expressão de outras citocinas, gerando um mecanismo autorregulatório de retroalimentação positiva com acentuada difusão sistêmica (19). O leucócito recrutado dentro do parênquima pancreático realiza a sua chegada ao sítio de lesão através do mecanismo de adesão e “rolamento” no endotélio vascular, com subsequente transmigração (diapedese). Este processo é realizado via moléculas de adesão, tais como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1,) que é fortemente regulada durante a inflamação (8,19). Concomitantemente, os macrófagos ativados liberam as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , também em resposta ao dano inicial ao pâncreas (5). Desta forma, um dos primeiros eventos na evolução da PA é a liberação destas citocinas no tecido pancreático (13,15). Em verdade, os níveis séricos de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  estão aumentados na fase aguda da inflamação pancreática, e os seus níveis estão correlacionados ao grau de gravidade desse processo inflamatório.

O TNF- $\alpha$  é produzido principalmente por células imunologicamente ativas, sendo os macrófagos sua principal fonte, embora os linfócitos T e B e os mastócitos também produzem e liberam o TNF- $\alpha$  (21). O TNF- $\alpha$  desempenha um papel proeminente nas reações inflamatórias, promovendo o extravasamento de neutrófilos, linfócitos e monócitos, aumentando a adesão local e permeabilidade das células endoteliais (13,22). Também afeta respostas imunológicas pelo controle de células T, estimulando a expressão na superfície celular de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I e classe II (MHC I e II - encontrados em

monócitos e linfócitos), geralmente em sinergia com IFN- $\gamma$ , induzindo a síntese de numerosas citocinas, incluindo IL-1, IL-6 (23). No SNC, o TNF- $\alpha$  possui várias funções e uma delas pode ser a responsável por danos à mielina, observado em doenças neurodegenerativas, onde ocorre a morte celular de oligodendrócitos. Além disso, o TNF- $\alpha$  circulante tem ação em regiões encefálicas onde a barreira hematoencefálica (BHE) está “ausente” tais como no hipotálamo (22,24). O TNF- $\alpha$  também é capaz de alterar a permeabilidade da BHE através da regulação dos níveis de ICAM-1 nas células endoteliais (21,24). Uma vez no SNC, o TNF- $\alpha$  é capaz de desencadear eventos danosos tais como a neuroinflamação e a excitotoxicidade. (21,22,24)

O IFN- $\gamma$  é um homodímero não covalente N-glicosilado produzido por células Th1 e NK ativadas por antígenos, mitógenos ou aloantígenos. O IFN- $\gamma$  é classificada como uma citocina pleiotrópica tendo a sua ação antiviral como principal atividade. Não obstante a essa função, o IFN- $\gamma$  também é indutor de efeitos antiproliferativos e imunomoduladores (25). O IFN- $\gamma$  é produzido por linfócitos que expressam os antígenos de superfície CD4 e CD8. A síntese de IFN- $\gamma$  é induzida, entre outros estímulos, por IL-2, BFGF (fator de crescimento fibroblástico básico) e EGF (fator de crescimento epitelial) (25).

Em linhas gerais, esses eventos mediados por citocinas repercutem em todo o organismo, sendo capazes de ativar de forma tecido-específico outras respostas inflamatórias em múltiplos órgãos cujas células sejam reativas a esses mediadores liberados a partir do pâncreas inflamado, como neste caso.

O IFN- $\gamma$  é uma importante molécula efetora em desordens desmielinizantes e a sua presença no SNC pode afetar o desenvolvimento do sistema nervoso. As células gliais não produzem IFN- $\gamma$  (23). De forma mais específica tem efeitos imunomoduladores que seriam a ativação de macrófagos/microglia e a indução da adesão e infiltração de leucócitos no SNC. Além disso, durante as reações inflamatórias, a produção dessa citocina resulta na ativação dos astrócitos, bem como na indução da expressão do MHC de classe I e II em astrócitos e microglia (23).



### 1.3 Inflamassomas (NLRP3, Caspase-1)

Os inflamassomas são plataformas intracelulares de proteínas que são formadas em resposta aos estímulos de amplo alcance e espectro, resultantes do recrutamento da procaspase-1, que após a clivagem, é transformada em caspase-1 enzimaticamente ativa (26). Como a caspase-1 é uma caspase pró-inflamatória, sua atividade é fortemente regulada pela autoativação dependente de sinal nos inflamassomas. Quatro desses inflamassomas foram identificados como NLR (repetição rica em leucina), NLRP1, NLRP3 e NLRC4 (26). Os inflamassomas NLRP1 e NLRC4 demonstraram ser ativados apenas por PAMPs (do inglês *pathogen-associated molecular pattern*), como o dipeptídeo muramil e flagelina, além do AIM2 especificamente ativado por DNA de fita dupla, que pode ser endógeno ou derivado de patógeno (27). O inflamassoma NLRP3 é particularmente interessante, no nosso estudo, pois pode ser ativado por uma gama de estímulos, que incluem doenças e alguns mediadores endógenos, como ROS (espécies reativas de oxigênio), DAMPs Damage-associated molecular pattern (do inglês – padrão molecular associado a dano). mitocondriais, ATP Adenosine triphosphate (do inglês - adenosina trifosfato) e o ácido úrico (27,28). Em termos estruturais, um inflamassoma típico contém um NLR e a proteína adaptadora ASC, que permite a associação por meio de interações do domínio CARD com a procaspase-1 (24). A procaspase-1, por conseguinte, sofrerá autoclivagem para formar o tetrâmero p10/p20 da caspase-1 ativada (24). A caspase-1 ativada é essencial para a maturação proteolítica de pró-IL1 $\beta$  e IL-18 em IL-1- $\beta$  e IL-18 clivadas e ativas.

A caspase-1 é uma caspase inflamatória que pode ser ativada durante a formação dos complexos inflamassomas em resposta aos mediadores derivados de patógenos endógenos e exógenos. Dentre as funções da caspase-1 ativada, a mais comumente descrita é a clivagem das proformas das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18 para as suas formas ativas em resposta a estímulos desencadeados por DAMPs e/ou PAMPs (28).

Atualmente, o papel da caspase-1 ativada na resposta imunológica inata tem sido identificado como sendo muito mais abrangente que a função originalmente reconhecida de maturação de citocinas. Há evidências crescentes de que a ativação da caspase-1 regula múltiplas funções celulares durante situações de danos à integridade dos tecidos, estendendo-se até mesmo a tipos de células que não são imunologicamente ativas ou de ativação imunológica facultativa, incapazes de

produzir grandes quantidades de citocinas inflamatórias (5,29). A caspase-1 é ativada em muitos tipos de células não imunológicas ou de ativação imunológica facultativa, como por exemplo os queratinócitos, astrócitos, hepatócitos e cardiomiócitos, onde a IL-1 $\beta$  e a IL-18 não são produzidos em níveis substanciais (5,30). Alguns estudos têm evidenciado o papel da caspase-1 como um regulador das respostas celulares durante lesões teciduais mediando as respostas de citoproteção ou de reparo e morte celular (17,29,31–33). Este aspecto da função da caspase-1 pode ser especialmente importante em células tais como, células epiteliais, células acinares pancreáticas, hepatócitos, neurônios e cardiomiócitos, onde o dano celular e tecidual podem ser a principal fonte de liberação de DAMPs dentro dos respectivos órgãos (28,30,34,35). A caspase-1 nesses tipos de células pode, portanto, ser um condutor crítico de respostas inflamatórias tanto a lesões estéreis quanto às causadas por estímulos infecciosos.

Foi sugerido que esta regulação do metabolismo contribui para a morte celular dependente da caspase-1 (31). Além disso, em um modelo de camundongo com dieta rica em gordura, a caspase-1 pode clivar SIRT1 (36), uma histona desacetilase que promove a secreção de insulina pelas células  $\beta$  (37) e aumenta a sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos (38). O processamento de SIRT1 pela caspase-1 após a formação do inflamassoma de NLRP3 resulta em uma redução da função de SIRT1 nas células (36), fornecendo uma explicação de porque camundongos sem caspase-1 ou NLRP3 estão protegidos da insulina induzida por dieta rica em gordura resistência, disfunção metabólica e obesidade (21,22,39).

O inflamassoma NLRP3 é uma molécula tripartida do domínio de ligação de nucleotídeos e da família de repetição rica em leucina (NLR), contendo um domínio NACHT de ligação de nucleotídeos com atividade ATPase, um domínio de pirina amino-terminal (PYRIN) e um domínio de leucina carboxi-terminal. domínio de repetição rica (LRR) (9). O NLRP3 controla a resposta inflamatória e coordena os mecanismos antimicrobiano do hospedeiro. Além disso, responde também a um conjunto diversificado de estímulos, que incluem ATP extracelular, material particulado (como sílica, cristais de ácido úrico, alúmen, amianto e outros compostos), híbridos de RNA-DNA, toxinas formadoras de poros e numerosos patógenos bacterianos, fúngicos, protozoóticos e virais (20,27). A ativação de NLRP3 também precisa de uma ativação por estímulos extracelulares, o que leva à indução transcricional e modificações pós-traducionais do NLRP3, que permitem a

ativação do respectivo receptor (29). Dada a grande variedade de estímulos, é provável que o NLRP3 responda a um evento celular comum que é disparado por esses ativadores. No entanto, muitos mecanismos diferentes foram propostos, incluindo a produção de ROS a liberação de DNA mitocondrial oxidado, desestabilização lisossomal, disfunção mitocondrial, a formação de grandes poros de membrana não específicos, alterações nos níveis de cálcio intracelular e efluxo de potássio (29). Em particular, foi descrito que o meio com baixo teor de potássio sozinho é suficiente para desencadear a ativação de NLRP3 (5).

O inflamassoma NLRP3 é expresso em diversos tipos celulares, sendo bem caracterizado em células com função imunológicas inatas, tais como macrófagos, neutrófilos, monócitos e células dendríticas (19,20). No entanto, é expresso também em uma grande variedade de células não imunológicas, tais como, células endoteliais, células da ilhota pancreática, hepatócitos e células musculares lisas vasculares, mas essa função do NLRP3 como uma plataforma inata nesses tipos celulares ainda é pouco compreendido(40,41). No geral, a ativação do inflamassoma NLRP3 pode ser gerenciada por diferentes processos moleculares, que podem ocorrer independentemente ou estar intimamente interligados. Desta forma, o papel do NLRP3 na resposta inflamatória sistêmica e as possíveis repercussões da sua ativação nos tecidos ainda não foram esclarecidas.

#### **1.4 Fatores Neurotróficos:**

A neurogênese e a neuroplasticidade são mecanismos-chave envolvidos em diferentes processos neurofisiológicos, como memória e aprendizado. No caso de uma interferência patológica, eles podem contribuir para o aparecimento de distúrbios psiquiátricos, em particular ansiedade e depressão, e/ou neurodegenerativos, como a doença de Alzheimer. É importante ressaltar que todas essas doenças também estão correlacionadas a um estado de inflamação crônica periférica ou central (42,43). Em 1988 foi relatado, que as células neuronais podem secretar fatores de sobrevivência, denominados neurotrofinas (43). Que são capazes de regular o crescimento, manutenção e apoptose dos neurônios tanto no SNC (sistema nervoso central) quanto no SNP (sistema nervoso periférico).

O BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) vem sendo descrito como uma neurotrofina que desempenha um papel fundamental no sistema nervoso

central, promovendo plasticidade sináptica, neurogênese e neuroproteção. Além disso, desempenham um papel crucial nas inflamações relacionadas ao córtex encefálico, afetando a aprendizagem e a memória (42,43).

Há uma relação entre inflamação e o papel do BDNF no encéfalo. Na presença de inflamação os níveis de BDNF estão reduzidos, impedindo desta forma a plasticidade sináptica, neurogênese e neuroproteção. Além disso, a infusão da interleucina IL1 $\beta$  no hipocampo reduz os níveis de BDNF nessa região, sugerindo que a inflamação tem a capacidade inibir a função do BDNF(43).

O NGF (fator de crescimento nervoso) é importante na plasticidade neuronal e na sobrevivência dos neurônios colinérgicos do prosencéfalo (córtex cerebral, hipocampo, prosencéfalo basal e hipotálamo), que são relacionados à memória (43). Considerando que o NGF é importante para as funções cognitivas, e diminui com o envelhecimento, conclui-se que o NGF pode contribuir para um declínio cognitivo dependendo da idade, desempenhando um papel significativo na memória, na cognição, no desenvolvimento, sobrevivência e manutenção de neurônios colinérgicos (42,43).

Além do exposto acima, um número cada vez maior de evidências apontam para o papel crítico dos fatores neurotróficos sobre a função e ativação da microglia. A relação entre mediadores inflamatórios que invadem o SNC e a produção de fatores neurotróficos envolvidos na homeostase tecido nervoso é de vital importância para compreensão da fisiopatologia das doenças neurodegenerativas e seus respectivos fatores desencadeadores (11). Desta forma, não se pode descartar que a ocorrência de uma inflamação, com impacto sistêmico, como no caso da PA, seja um fator interferente sobre as funções dos fatores neurotróficos nas células gliais em geral e no nosso estudo, na própria microglia (11,16,44).

## **1.5 Microglia**

A microglia é uma célula residente do SNC e tem um papel importante nas doenças infecciosas, reconhecendo e fagocitando patógenos e debris resultantes de morte celular. Presente em todo SNC como uma espécie de sentinela, a microglia é a primeira célula a reagir durante o processo inflamatório, como uma espécie de sensor biológico (32,45–48). No encéfalo saudável, a microglia movimenta seus prolongamentos em várias direções com o objetivo de monitorar o microambiente.

Além disso, é possível encontrar dois tipos básicos dessa célula: morfologia ramificada (arborizada) em todo o parênquima encefálico e, de modo muito particular, ameboide nas regiões circunventriculares (49). A forma arborizada, orientada radialmente, está presente em maior número no SNC, sendo a forma mais abundante em um cérebro saudável (45). No entanto, *debris* de células mortas fazem com que a microglia altere sua morfologia e, conseqüentemente, o seu estado funcional, tornando-a com aspecto ameboide, fenótipo conhecido por ser um estado fagocítico. Uma forma reativa também é encontrada no SNC em resposta às doenças encefálicas, sendo essas doenças inflamatórias e/ou infecciosas. Entretanto, nesses casos, a microglia apresenta prolongamentos retraídos e espessos, além de uma morfologia alongada em forma de bastão (Figura 1) (49).

A microglia reage aos estímulos periféricos oriundos de doenças inflamatórias crônicas, como diabetes, artrites, e de doenças infecciosas tais como: pneumonia e sepse. Independente de serem de caráter infeccioso ou não, essas doenças liberam IL1- $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  na circulação sanguínea, que alcançam o SNC e causam uma resposta das células gliais, incluindo a microglia. Essa resposta envolve a síntese ou regulação positiva de receptores conhecidos e especializados no reconhecimento de DAMPs e PAMPs, tais como: os receptores do tipo Toll (Toll-like). Os receptores CSF1R (*colony stimulating factor receptor 1*) e RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) também são encontrados expressos na microglia ativada (44–46,50).

Nos últimos anos, pesquisadores têm convencionando a terminologia microglia ativada para indicar um fenótipo de ativação contínua que se situa entre o estado vigilante (ou em “repouso”) e o de plena ativação (14,49). A diferenciação da microglia para este fenótipo ativado tem sido atribuído a diversos fatores. Atualmente, os mais conhecidos e aceitos decorrem das mudanças locais nos mediadores solúveis e celulares expressos por neurônios e astrócitos que induzem a uma via de escape do microambiente inibitório dessa ativação no SNC (14,49). Sob estímulos crônicos vindo da periferia, as células da microglia permanecem ativadas ao invés de retornar para um estado de vigilância, semelhante ao observado em animais saudáveis. A microglia ativada responde de forma muito mais exacerbada a um segundo estímulo do que ao primeiro(11). As células microgliais de animais acometidos por doenças crônicas apresentam um fenótipo constante. Esse fenômeno de ativação constitutiva também é observado na DA, acompanhado de um aumento no número de microglia por milímetro quadrado. Há relatos na literatura

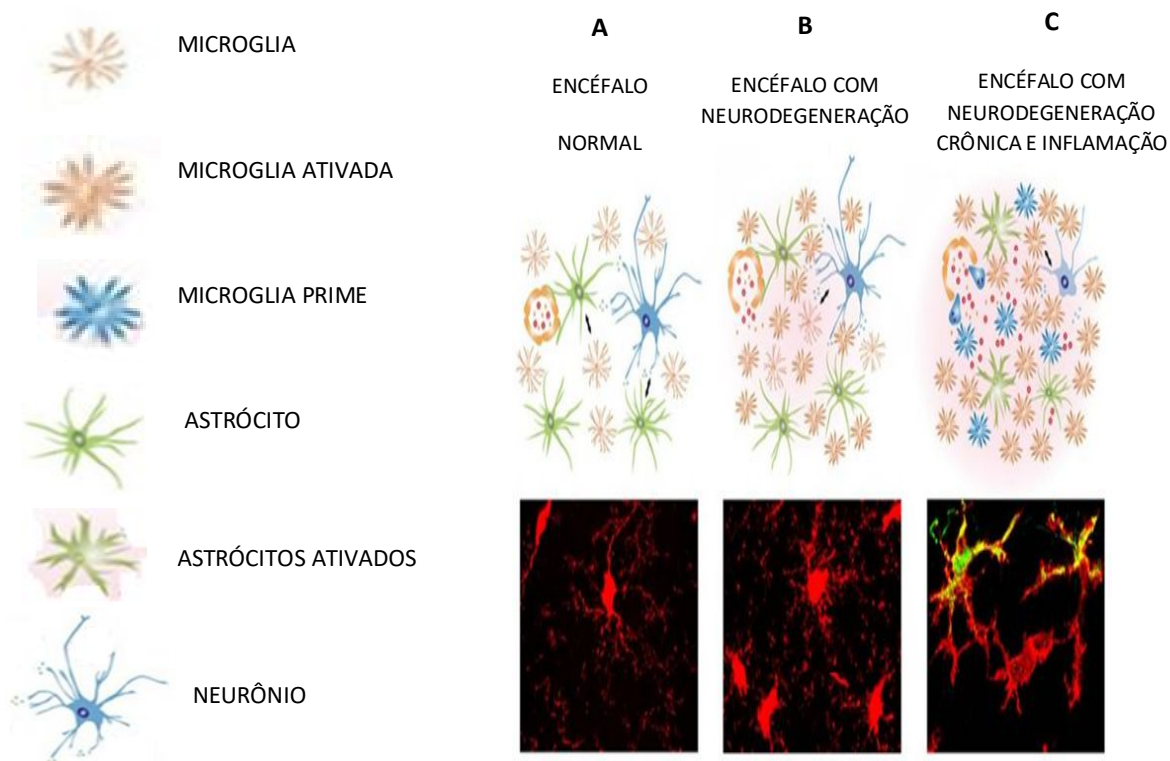
de que pacientes com DA, quando acometidos por uma infecção pulmonar, por exemplo, têm o seu quadro clínico afetado, cursando com acentuada perda de memória, além de episódios de delírio (11,51). A proliferação e ativação dessas células aceleram o curso das doenças neurodegenerativas. Adicionalmente, um aumento considerável no número das células microgliais é observado na DP, esclerose lateral amiotrófica e DA (52). E a partir de inúmeras pesquisas sobre a pancreatite aguda, não foi relatado se um processo inflamatório estéril sistêmico é capaz de afetar a micróglia, mas identificou-se estudos que relatam outras doenças como: infecção pulmonar, DA, esclerose lateral amiotrófica, com capacidade de afetar a microglia. Com isso despertou o interesse se a PA poderia causar alteração fenotípica da microglia.

Uma resposta inflamatória sistêmica resulta na produção de citocinas que circulam no sangue e se comunicam com neurônios dentro do encéfalo, tais como: IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . Existem várias rotas diferentes pelas quais uma resposta inflamatória sistêmica pode comunicar-se com o SNC (46). A primeira dessas rotas envolve os órgãos circunventriculares, os quais apresentam uma barreira hematoencefálica pouco densa. Nesses órgãos, as citocinas se difundem livremente do sangue para o parênquima encefálico, onde podem interagir com as populações de células gliais, imunologicamente ativas tais como micróglia e astrócitos (5,9,23). A segunda via principal pela qual as citocinas se comunicam com o encéfalo é através da barreira hematoencefálica em sua constituição integral. As citocinas ativam o endotélio, que por sua vez sinaliza para os macrófagos perivasculares localizados imediatamente adjacentes às células endoteliais: esses macrófagos perivasculares comunicam-se com a micróglia (23). Uma terceira via foi identificada envolvendo as aferências sensoriais do nervo vago que se comunicam com populações neuronais dentro do tronco encefálico. Em condições inflamatórias periféricas, citocinas pró-inflamatórias são expressas no interior do X par craniano. A expressão dessas citocinas pode ser modulada por prostaglandinas secretadas após inflamações em órgãos periféricos. Finalmente, uma quarta via envolve o transporte ativo direto de citocinas através da barreira hematoencefálica e as evidências sugerem que, ao fazê-lo, elas podem impactar os processos cognitivos (52).

Um componente chave do processo de sinalização do sangue para o encéfalo é a ativação de populações de macrófagos no sistema nervoso central. Essas populações de macrófagos sintetizam mediadores inflamatórios, os quais

podem ser secretados periféricamente. Por sua vez, essas moléculas pró-inflamatórias promovem a síntese de prostaglandinas, que interagem com neurônios ao redor do encéfalo e podem interferir na atividade neuronal (52). Entretanto, é importante entender que, durante esse processo de sinalização, não há evidências de danos à barreira hematoencefálica ou às populações de neurônios dentro do cérebro.

Em condições de exacerbação da resposta inflamatória local ou sistêmica, efeitos deletérios irreversíveis ao SNC podem ocorrer, acometendo neurônios de diferentes regiões do encéfalo (44,48). Isto já foi observado na sepse, que por sua vez, tem sido associada à ativação microglial em humanos (53), que também é observada em animais tratados com LPS (Lipopolissacarídeo) bacteriano (54). Como um bom sensor, as células microgliais detectam sinais inflamatórios oriundos da “periferia” e respondem, por vezes, de modo exacerbado e incontrolável. Esse tipo de resposta tem papel importante no curso deletério da DA e pode ser um ponto chave para explicar os episódios de delírio associados a doenças que cursam com síndrome inflamatória sistêmica (14,44,55–57).



Modificado de Gomez-Nicola *et al.*, *Neuroscientist*. 2015; 21(2): 169–184

**Figura 1 - Impacto da inflamação sistêmica na progressão da neurodegeneração crônica: microglia ativada.** Representação esquemática do *cross-talk* da microglia com neurônios e astrócitos em um encéfalo normal (A), durante a neurodegeneração crônica (B) e quando a neurodegeneração crônica está combinada a um evento inflamatório sistêmico (C). Em um encéfalo saudável, a microglia *surveillant* mantém a homeostase cerebral, além de renovada por uma proliferação local. Astrócitos e microglia comunicam-se com neurônios para dar suporte às suas funções e sobrevivência, entre outras funções. (B) Na neurodegeneração crônica, a microglia após uma cascata inflamatória torna-se ativada. A população microglial é expandida principalmente por uma proliferação local. Já os astrócitos, perdem o controle sobre a BHE e os mediadores inflamatórios e células entra no encéfalo. Neurônios sob um dano progressivo, porém limitado. (C) Quando a neurodegeneração crônica está combinada a um evento inflamatório sistêmico, a microglia torna-se ativada e sua atividade exagerada, causando danos aos neurônios, acelerando a doença. Além disso, os astrócitos tornam-se ativados e ainda contribuem para o dano neuronal. (A-C) As células microgliais (vermelho) em diferentes condições funcionais e morfológicas. Em C, células microgliais ativada são deslocadas para um fenótipo pró-inflamatório, expressando IL1 $\beta$  (verde). A legenda para os diferentes fenótipos e tipos celulares é apresentada ao lado do esquema.



## 2. JUSTIFICATIVA

Com base no exposto acima, o nosso estudo teve como meta investigar a possibilidade de alguns dos mediadores inflamatórios sistêmicos, produzidos durante a PA, alcançarem as regiões do parênquima encefálico, especificamente o hipocampo, onde poderiam alterar o fenótipo da microglia. Ressalta-se que a presença de agentes exógenos nessa região interferiria de maneira deletéria na homeostase do microambiente do hipocampo através de alterações morfológica e aumento de número das células gliais, a microglia.

## 3. OBJETIVO

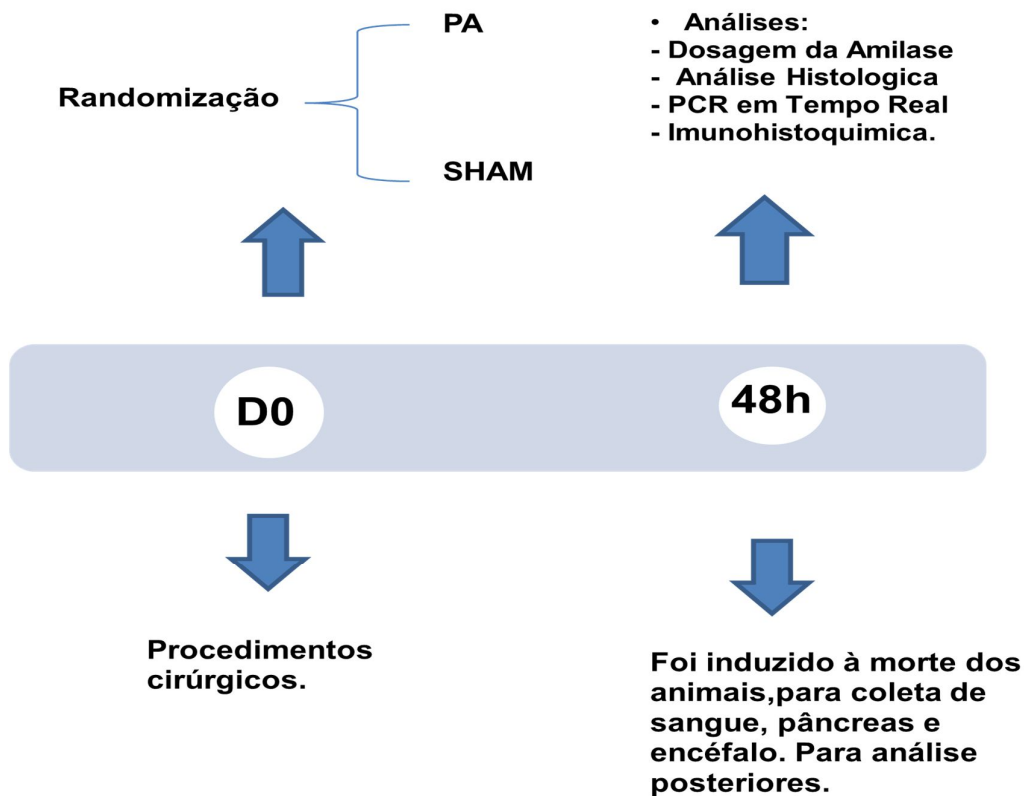
O presente estudo teve como objetivo avaliar as possíveis influências e repercussões da inflamação pancreática sobre o perfil de ativação da microglia no parênquima encefálico.

## 4. METODOS

Foram utilizados 16 ratos, (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, de sexo feminino, com dois meses de idade e peso médio de ( $\pm$  160g), oriundos do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da UFRJ. Eles foram mantidos em um ambiente livre de patógenos específicos, sob condições padrão de alocação de animais (temperatura entre 20 e 24 ° C, umidade relativa em torno de 50-60%, com 12 h de período de luz e 12 h de escuro (período), alimentados com ração específica, água *ad libitum* e ambiente controlado com atenção ao ciclo circadiano. Todos os animais foram expostos às mesmas condições ambientais durante o experimento.

O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética para Uso de Animais na Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEUA-CCS-UFRJ), registrado no Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) (processo 01200.001568/2013-87) e aprovado para execução.( Anexo 2)

#### 4.1 Desenho da Evolução temporal:



**Figura 2 - Evolução temporal PA.** Pancreatite Aguda; Sham - apenas laparotomia, com exposição do Pâncreas.

#### 4.2 Procedimento Cirúrgico para Indução dos Grupos Experimentais

Os animais foram sedados e anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina 5%, na dose de 100mg/kg combinada com cloridrato xilazina 2% na dose de 10 mg/kg. Após a administração anestésica, os animais foram imobilizados em decúbito dorsal, foram tricotomizados e degermados com digluconato de clorexidina 4%, seguido de solução de clorexidina alcoólica 2%. Após esses procedimentos realizou-se uma incisão mediana com 4 cm de comprimento para acesso à cavidade abdominal, em todos os animais.

Os animais foram distribuídos em dois grupos, cada um contendo oito ratos.

Grupo Sham – (n=8) os animais deste grupo foram submetidos à laparotomia com manipulação do pâncreas e das vísceras a ele adjacentes.

Grupo pancreatite aguda (PA) – (n=8) – os animais deste grupo foram submetidos à laparotomia e à ligadura da porção esplênica do pâncreas.

Decorrido 48h do ato operatorio foram coletado uma amostra de sangue (1ml) por punção intracardiaca em todos os animais e colocada no tubo de coleta a vácuo de tampa vermelha sem solução anticoagulante, para a dosagem da amilase sérica.

. A peculiar arquitetura anatômica do pâncreas do rato dificulta, muitas vezes, a identificação da glândula e a identificação do segmento que deve ser ressecado. Este fato gerou uma variada nomenclatura empregada para descrever as ressecções pancreáticas nestes animais.(58) Para sistematizar a nossa pesquisa resolvemos empregar a divisão segmentar do pâncreas e utilizamos a ligadura na porção esplênica do pâncreas que corresponde aproximadamente a 10% da sua massa (Figura 3).

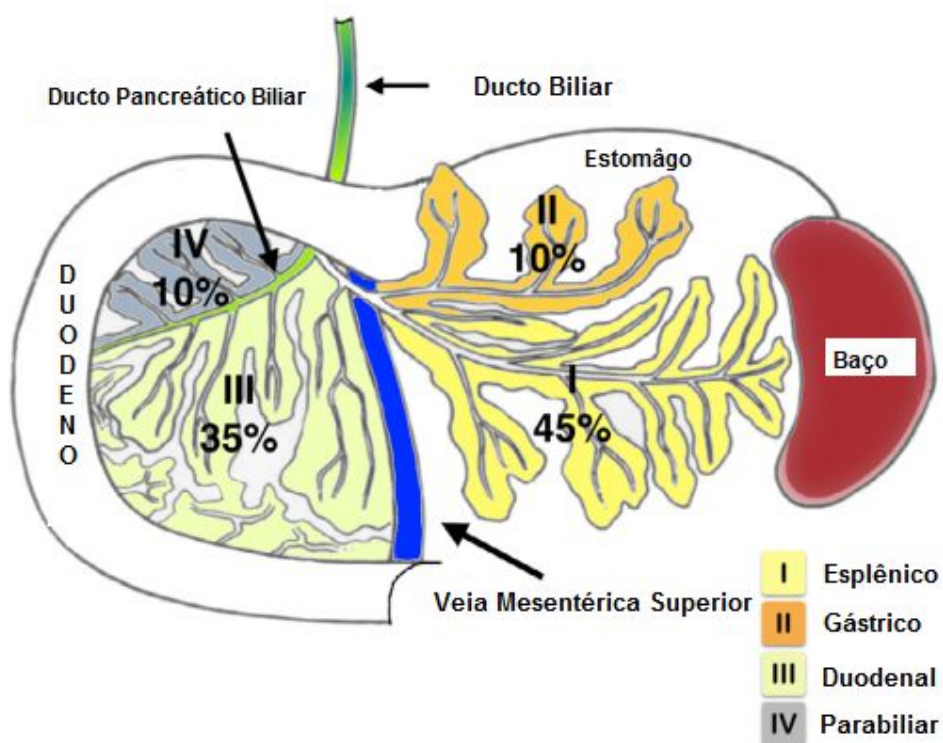


Figura 3 - Esquema da divisão segmentar do pâncreas de ratos e os percentuais relativos de massa de tecido. Eulálio JMR et al., Acta Cirúrgica Bras. 2016;31(10):698–704.

Nos animais do Grupo PA, após a abertura da cavidade peritoneal identificamos a porção esplênica do pâncreas, e realizamos a sua ligadura com fio de algodão 0. Em sequência, a cavidade peritoneal e a pele foram fechadas em plano único com fio de sutura mononylon 4.0.

Para avaliar se a manipulação cirurgica levaria à ativação de dano ao pâncreas, os animais do grupo Sham, após a abertura da cavidade peritoneal, o pâncreas foi identificado, exposto e suavemente manuseado, assim como o estômago e o baço. Em sequência a cavidade peritoneal e a pele foram suturadas com pontos simples com fio de sutura mononylon 4.0

Após a operação os animais foram alojados no biotério de acordo com as condições anteriormente descritas.

A analgesia pós-operatória consistiu de dipirona (25mg / kg), por via subcutânea no primeiro momento após a cirurgia e depois foi feito de forma oral colocando na água do animal, a cada 8h, até o momento da sua morte.

Decorrido 48 horas da operação, os animais de cada grupo foram induzidos à morte por deslocamento cervical com o animal profundamente sedado e foi realizada a verificação dos reflexos e capacidade de movimento respiratório e cardíaco.

Após a morte dos animais, o pâncreas e o encéfalo foram imediatamente removidos. As amostras do pâncreas foram preparadas para H&E (hematoxilina-eosina) e avaliação por RT-PCR. Enquanto o encéfalo foram preparados para a avaliação por RT-PCR e análise imunohistoquímica.

#### **4.3 Análise histológica do pâncreas:**

Os tecidos pancreático dos diferentes grupos foram colhidos e lavados em tampão fosfato de sódio (PBS), e fixado em formol tamponado por 24 horas, posteriormente as amostras foram lavadas em água corrente e acondicionadas em cassetes previamente identificados, para processamento. Que consistiu em desidratação pelo álcool (70%, 80%, 90%, e 100% respectivamente), diafanização pelo xilol, (dois banhos) e impregnação pela parafina a 60°C, por 60 minutos. Em seguida o material foi emblocado em parafina e reservado para microtomia. Foram

realizados cortes de 5  $\mu\text{M}$  em micrótomo rotatório, os cortes foram distendidos em banho maria, pescados em lâminas foscas e levados para estufa a 60°C, por aproximadamente duas horas. Após este período foi realizada a desparafinização pelo xilol (quatro banhos), a reidratação pelo álcool (quatro banhos), seguido de lavagem em água corrente e destilada por 5 minutos. As lâminas foram coradas pelo método hematoxilina-eosina (H&E), lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, clarificadas em xilol, montadas com lamínulas de vidro e reservadas para análise em microscópio ótico (Nikon Eclipse 80i).

#### 4.4 Procedimento de Expressão Gênica por RT-PCR em tempo real:

As amostras teciduais do encéfalo e do pâncreas, foram congeladas em nitrogênio líquido, armazenadas em freezer -80°C e homogeneizadas em reagente Trizol (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante para isolar o RNA total, tal como previamente descrito (Gómez-Nicola et al., 2011). O RNA isolado foi quantificado por espectrofotometria (Nanodrop ND-1000; Thermo Fish Scientific) e convertido em cDNA com um kit de transcrição reversa em cDNA de alta capacidade (Thermo Fisher Scientific) depois de verificar a sua integridade por electroforese em um gel de agarose a 2%. As bibliotecas de cDNA foram analisadas por RT-PCR utilizando o GoTaq PCR Master Mix (Promega) e *primers específicos para cada gene* - Sigma-Aldrich (Figura 4). A amplificação de cDNA foi detectado por fluorescência verde (SYBR green fluorescence) usando um termociclador Mastercycler ep Realplex (Eppendorf). A qualidade dos primers da PCR foi avaliada através de electroforese em gel de agarose a 1,5%, verificando o tamanho do produto de PCR. Cada amostra foi avaliada em duplicata, e a expressão gênica foi normalizada pelo gene de referência (Housekeeping gene, acidic ribosomal phosphoprotein P0, 36B4, Forward AATCCTGAGCGATGTGCAG Reverse: GCTGCCATTGTCAAACAC. Os dados foram analisados usando o método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , onde  $\Delta\text{Ct}$  é o resultado da subtração do gene de referência pelo gene de interesse e o  $\Delta\Delta\text{Ct}$  foi calculado em relação aos animais controles.

Gene	Forward (FW)	Reverse (RV)
<b>PÂNCREAS</b>		
<b>Inflamassoma:</b>		
<i>NLRP3</i>	TCACCCAAGGAGGAAGAAGA	GTCTGGAAGAACAGGCAACA
<i>CASPASE-1</i>	CACAGCTCTGGAGATGACAAA	CTGGAGACCATGAGACATGAATAC
<b>ENCÉFALO</b>		
<b>Citocinas:</b>		
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	CAGCCGATTTGCCATTTTCATAC	GGCTCTGAGGAGTAGACGATAA
<i>INF-<math>\gamma</math></i>	GATGTGCGGATACCTGAAGC	AGGGATGCCAACATGACTGA
<b>Inflamassoma:</b>		
<i>Caspase-1</i>	CACAGCTCTGGAGATGACAAA	CTGGAGACCATGAGACATGAATAC
<i>NLRP3</i>	TCACCCAAGGAGGAAGAAGA	GTCTGGAAGAACAGGCAACA
<b>Fatores Neurotróficos:</b>		
<i>NGF</i>	ACACTCTGATCACTGCGTTTTTG	CCTTCTGGGACATTGCTATCTGT
<i>BDNF</i>	CTTTTGTCTATGCCCTGCAGCCTT	AGCCTCCTCTGCTCTTTCTGCTGGA

**Figura 4 - Primers de genes específicos.**

#### **4.5 Análise Imuno-histoquímica:**

Foram obtidos cortes coronais do encéfalo com espessura de 3 micrômetros em lâminas silanizadas, as lâminas foram acondicionadas em estufa a 60°C. por 60 minutos. Em seguida foram desparafinizadas em xilol, reidratadas em álcool,

lavadas em água corrente e destilada por 5 minutos, e submetidas ao bloqueio de peroxidase endógena (peróxido de hidrogênio 0,3%) por 10 minutos, seguido de lavagem em água corrente e destilada por 5 minutos e acondicionadas em tampão TBS pH 7,6 por 5 minutos 2X, os espécimes foram submetidos à solução de bloqueio de proteína contendo 10% de soro fetal bovino (FBS - Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 3% de soro albumina bovina (BSA Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) em PBS por 30 minutos, e em seguida lavadas em água corrente e destilada por 5 minutos e acondicionadas em TBS pH 7,6 por 5 minutos 2X. Os cortes foram incubados com anticorpo primário Anti-Iba1 Rabbit monoclonal Abcam [EPR16588] (1:100) e Anti-PU.1 (EPR3158Y) Rabbit Monoclonal Sigma-Aldrich (1:500), cinco lâminas de cada, em câmara úmida a 4°C. Após pernoite, o material foi lavado em água corrente e destilada por 5 minutos cada lavagem. Em seguida, sendo lavado duas vezes em TBS por 5 minutos cada e incubadas com anticorpo secundário (Polímero HRP-anti rabbit – NISCHEREI) por 30 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada por 5 minutos e acondicionadas em TBS 5 minutos 2X, incubadas em DAB cromógeno, contracoradas com hematoxilina de Harris por 30 segundos, lavadas em água corrente por 10 minutos, desidratadas em álcool, clarificadas em xilol e montadas com goma de Damar para posterior análise.

#### **4.6 Procedimentos da Análise Bioquímica (Dosagem sérica da Amilase):**

Decorridos 48h de pós-operatório, amostras de 1 mL de sangue dos ratos PA e Sham foram coletadas em tubo a vácuo sem EDTA. Em seguida, o material foi centrifugado na rotação de 3200 rpm (2000 g) por 10 minutos. O soro foi coletado e submetido à análise no equipamento BS-380-Mindray (Mindray Building, Nanshan, SZ, China) para leitura das amostras, usando o kit da Bioclin de amilase cinética - ref K046 (Quibasa-Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). As leituras foram realizadas em 1, 2 e 3 minutos. Após a leitura, foi calculada a média das diferenças de absorvância por minuto para se obter o resultado final.

## 4.7 Análise Estatística

Cada variável foi testada quanto à normalidade e variância usando os testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (SD) do número indicado de experimentos e analisados com o Prism 6 software package (*GraphPad Software*). Os valores dos grupos foram comparados pelo teste t de Student ou teste U de Mann-Whitney com base na distribuição paramétrica ou não paramétrica das variáveis contínuas. As diferenças foram consideradas significativas com um valor de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

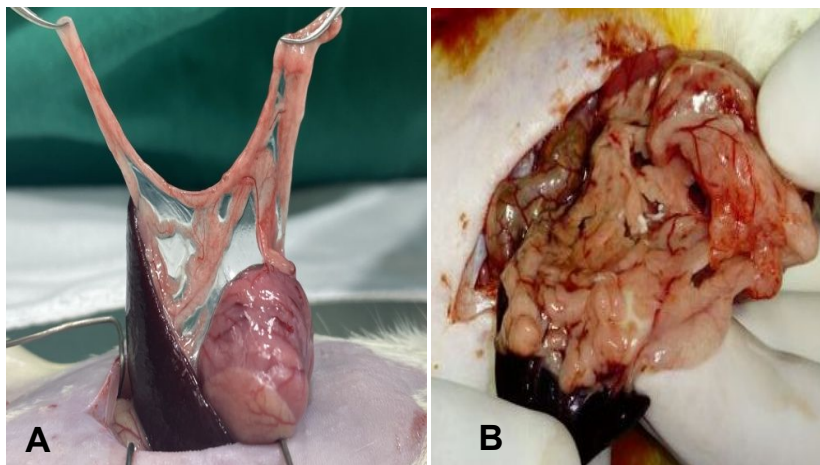
### 5.1 -Características Clínicas:

Todos os 16 animais estavam em estado clínico normal. Os animais tiveram boa recuperação anestésica e nenhuma complicação operatória. Os animais do grupo PA, 6 horas após a cirurgia, ficavam em posição antálgica, arqueados, movimentavam-se pouco mantendo-se parados em determinados lugares da caixa, sinalizando dor abdominal, imediatamente administrava-se dipirona oral e os animais voltavam a seus hábitos normais.

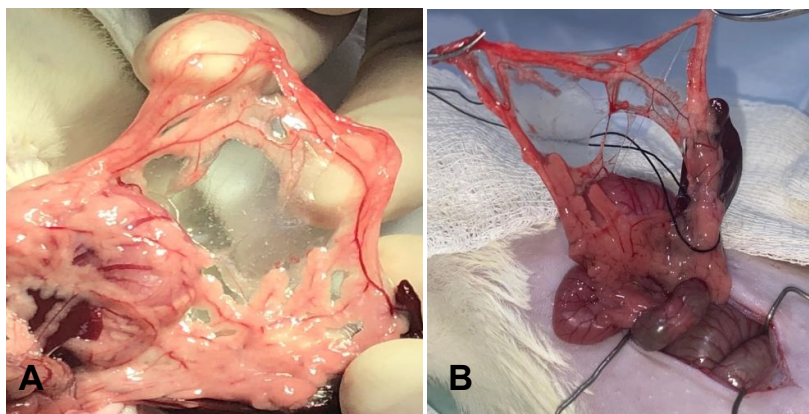
### 5.2 Características macroscópicas do pâncreas após a indução de PA:

. Os animais do grupo Sham, apresentaram à macroscopia, edema pancreático (Figura 5). Já o pâncreas dos animais do grupo PA, mostramos a onde foi realizado a ligadura no pâncreas e o exame macroscópico evidenciou, áreas esbranquiçadas, correspondente a esteatonecrose, hemorragia e edema. (Figura 6 e 7).

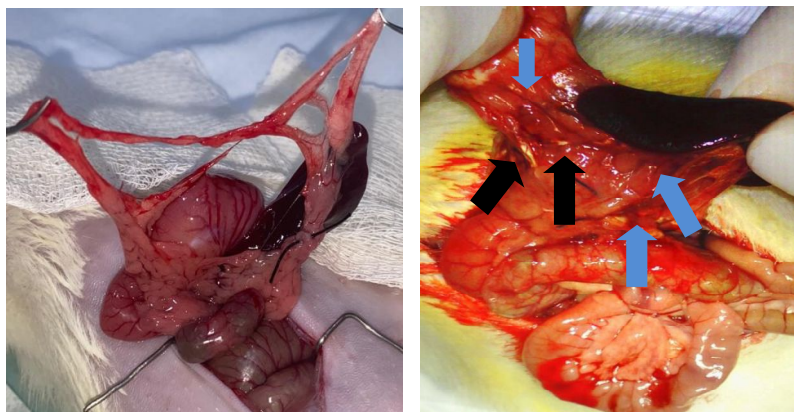




**Figura 5 - Análise macroscópica do pâncreas.** (A) Grupo Sham, onde nota-se o pâncreas antes do procedimento cirúrgico e sem qualquer alteração macroscópica. B) Grupo Sham com pâncreas apresentando edema moderado 48h após a manipulação do pâncreas e vísceras apenas.



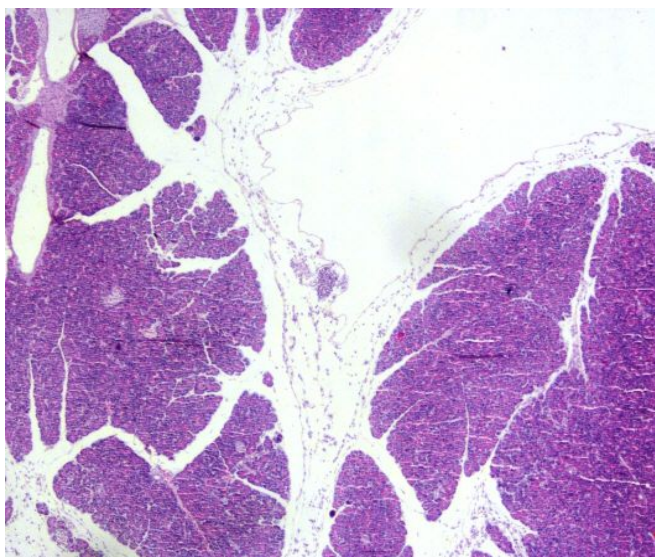
**Figura 5 - Análise macroscópica do modelo de pancreatite aguda induzida por ligadura da porção esplênica do pâncreas de rato.**A) Pâncreas antes do procedimento cirúrgico, sem qualquer alteração macroscópica. B) Pâncreas, foto do local onde foi realizado a ligadura na região esplênica do pâncreas.



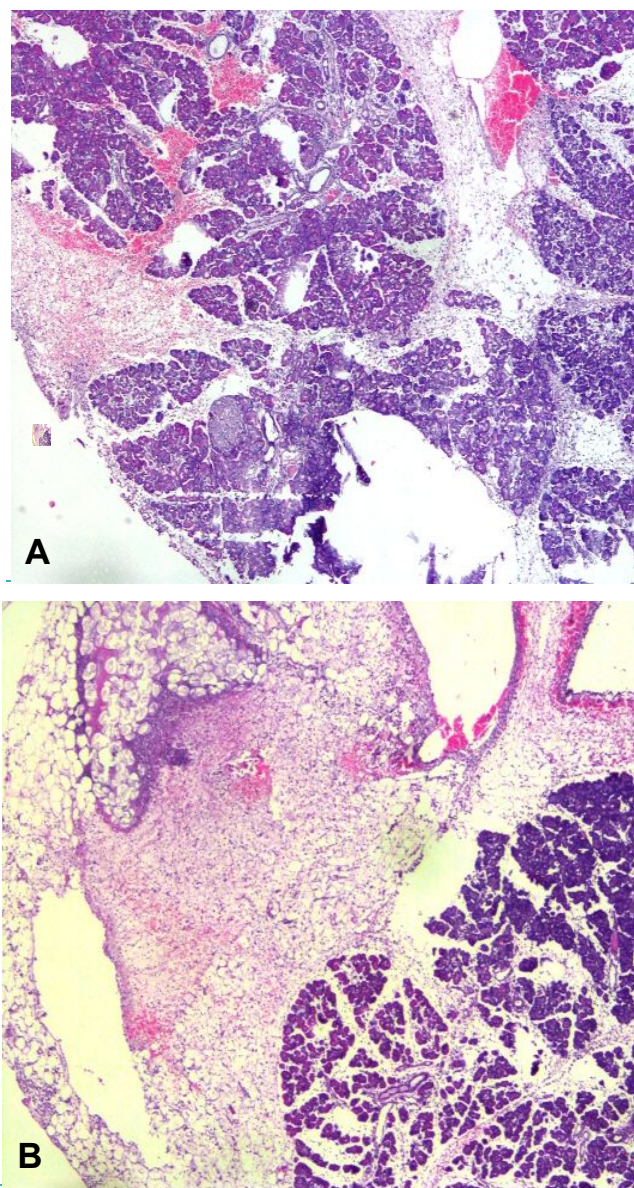
**Figura 7 - Análise macroscópica do modelo de pancreatite aguda induzida por ligadura da porção esplênica do pâncreas de rato.** A) ligadura feita no pâncreas no dia da cirurgia. B) Foto do pâncreas, após 48h do procedimento cirúrgico, apresentando edema, esteatonecrose e hemorragia. Setas azuis: presença de hemorragia e setas pretas: áreas com esteatonecrose.

### 5.3 Análise Histológica do Pâncreas -:

No grupo Sham, o pâncreas apresentava discreto edema e escasso infiltrado inflamatório intersticial (figura 8). Enquanto que no grupo PA se observou pancreatite aguda caracterizada por necrose parenquimatosa, esteatonecrose, focos de hemorragia e de infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear (figura 9). Em ambos os grupos o encéfalo não apresentou alterações histológicas significativas. Não foi observada proliferação glial.



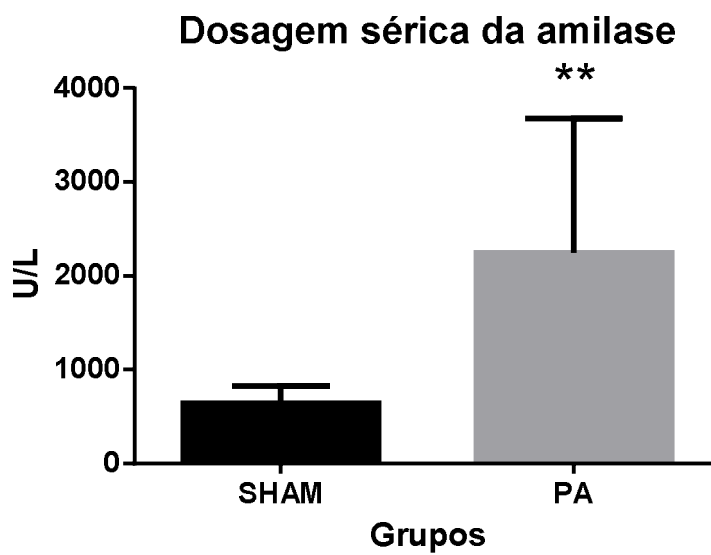
**Figura 8 - Análise histopatológica do tecido pancreático de ratos do grupo Sham.** Corte histológico do pâncreas de rato do grupo Sham, mostrando edema leve e infiltrado inflamatório intersticial esparsos, 48 horas após laparotomia apenas com a manipulação do pâncreas vísceras adjacentes. H&E20X.



**Figura 9 - Análise histopatológica do tecido pancreático de ratos do grupo PA.** Corte histológico do pâncreas de ratos do grupo PA 48 horas após a ligadura da porção esplênica do pâncreas mostram pancreatite aguda, caracterizada por necrose parenquimatosa (A), esteatonecrose, focos de hemorragia e infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear (A e B). (H&E 40X).

#### 5.4 Análise da Amilase sérica:

Encontrou-se aumento do nível sérico da amilase nos animais do grupo PA em comparação ao animais do grupo Sham. (Figura 10).



**FIGURA 10.** Nível de amilase sérica 48 horas após pancreatite aguda (PA) induzida por procedimento de ligadura na porção esplênica do pâncreas de ratos. Os níveis de amilase detectados no grupo PA (barra cinza) foram significativamente maiores quando comparados aos do grupo Sham (barra preta). (\*\* P < 0,05).

### 5.5 Análise do Pâncreas por RT - PCR em Tempo Real:

Encontrou-se aumento da expressão de genes do inflamassomo NLRP3 e Caspase-1 nos animais do grupo PA em comparação ao animais do grupo Sham. (Figura 11 e 12).

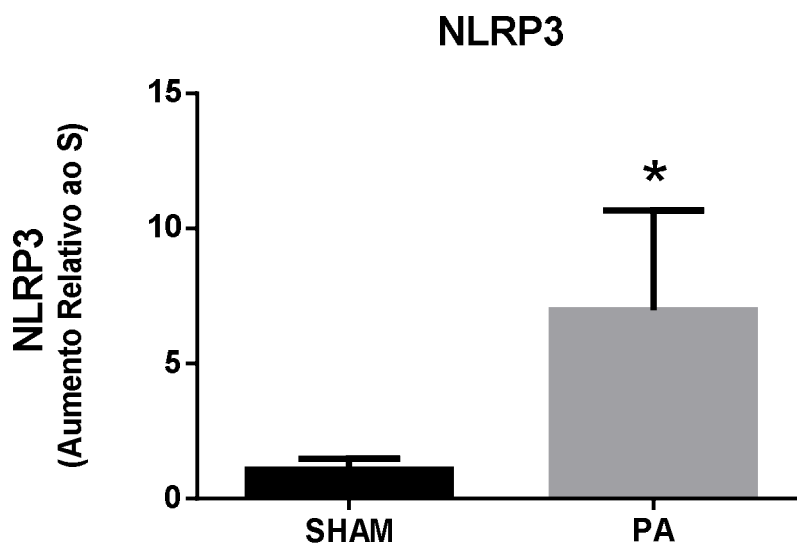
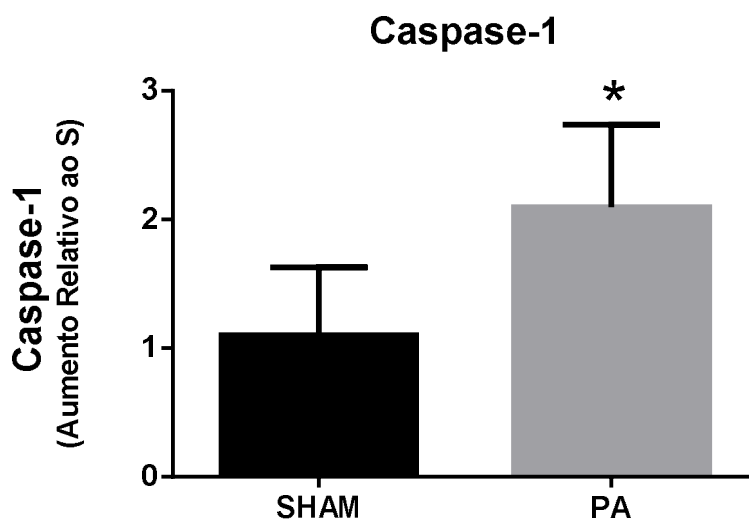


Figura 11 - Análise quantitativa por RT-PCR do mRNA do inflamassoma NLRP3 no pâncreas de ratos do grupo pancreatite aguda (PA) e Sham. O gráfico mostra um aumento significativo nos níveis de mRNA de NLRP3 no pâncreas de ratos no grupo PA (barra cinza) em comparação com o grupo Sham (barra preta). (\* P < 0,05).



**Figura 12 - Análise quantitativa por RT-PCR do mRNA do inflamassoma caspase-1 no pâncreas de ratos dos grupos pancreatite aguda (PA) e Sham..** O gráfico mostra um aumento significativo nos níveis de mRNA de caspase-1 no pâncreas de ratos no grupo PA (barra cinza) em comparação com o grupo Sham (barra preta). (\* P <0,05).

### 5.6 Análise do tecido encefálico Encéfalo por RT-PCR :

Para a avaliação no encéfalo, foram analisada as citocinas: TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e os inflamassomo: Caspase-1 e NLRP3. Nos animais do grupo PA, foram observados aumento de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e NLRP3 em relação ao grupo Sham. Enquanto a caspase-1 apresentou um aumento não significativo no grupo PA comparado ao grupo Sham. (Figura 13,14,15 e 16).

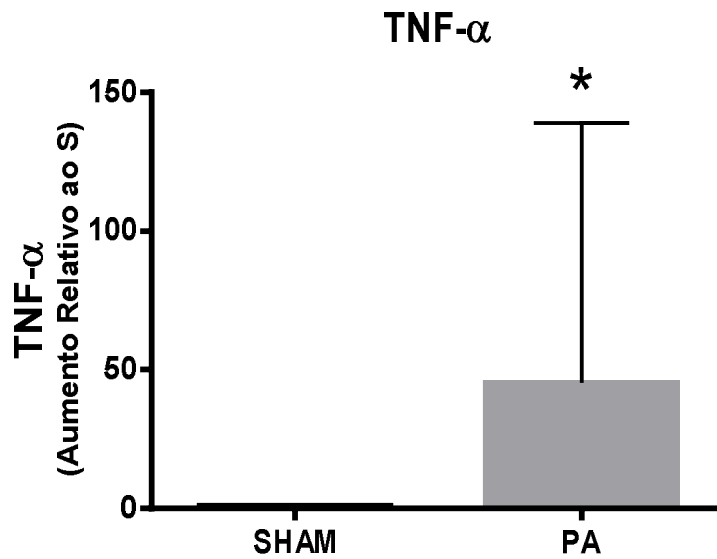


Figura 13. Análise quantitativa por RT-PCR do mRNA do TNF- $\alpha$  no encéfalo de ratos dos grupos pancreatite aguda (PA) e Sham. O gráfico mostra um aumento significativo nos níveis de mRNA de TNF- $\alpha$  no encéfalo de ratos do grupo PA (barra cinza) em comparação ao do grupo Sham (barra preta). (\* P < 0,05).

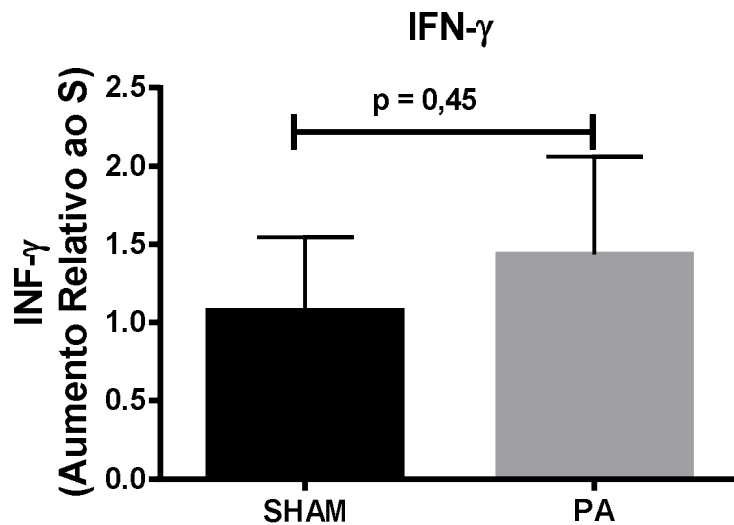


Figura 14. Análise quantitativa por RT-PCR do mRNA do TNF- $\alpha$  no encéfalo de ratos dos grupos pancreatite aguda (PA) e Sham. O gráfico mostra que não há diferenças significativas nos níveis de mRNA de IFN- $\gamma$  no encéfalo de ratos no grupo PA (barra cinza) em comparação com o grupo Sham (barra preta). (\* P = 0,45).



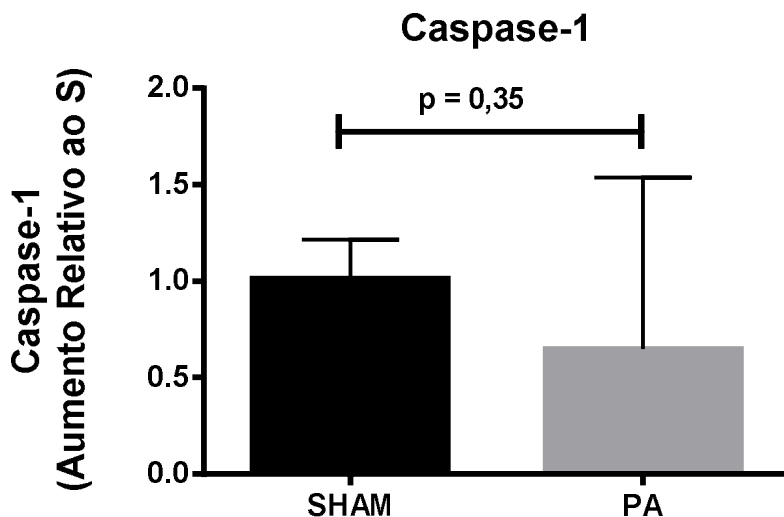


Figura 15. Análise quantitativa por RT-PCR do mRNA do caspase-1 no encéfalo de ratos dos grupos pancreatite aguda (PA) e Sham. O gráfico mostra que não há diferenças significativas nos níveis de mRNA de caspase-1 no encéfalo de ratos no grupo PA (barra cinza) em comparação com o grupo Sham (barra preta). (\* P =0,35).

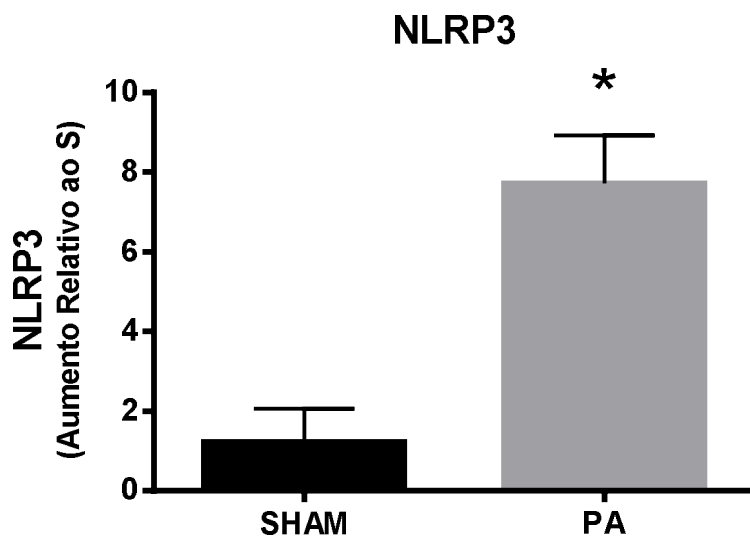
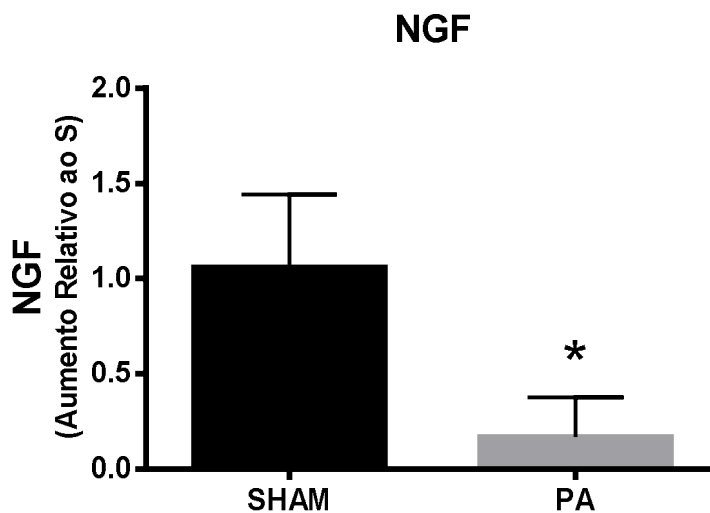
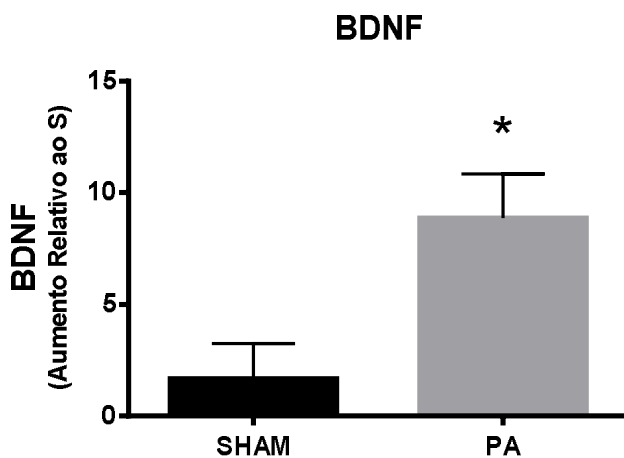


Figura 16 - Análise quantitativa por RT-PCR do mRNA do inflamassoma NLRP3 no encéfalo de ratos dos grupos pancreatite aguda (PA) e Sham. O gráfico mostra um aumento significativo nos níveis de mRNA de NLRP3 no encéfalo de ratos no grupo PA (barra cinza) em comparação com o grupo Sham (barra preta). (\* P <0,05).

Para a avaliação de fatores neurotróficos, obteve-se a expressão de NGF e BDNF. Observou-se que o grupo PA apresentou redução de NGF, e aumento de BDNF, comparando-se ao grupo Sham, de forma significativa (Figura 17 e 18).



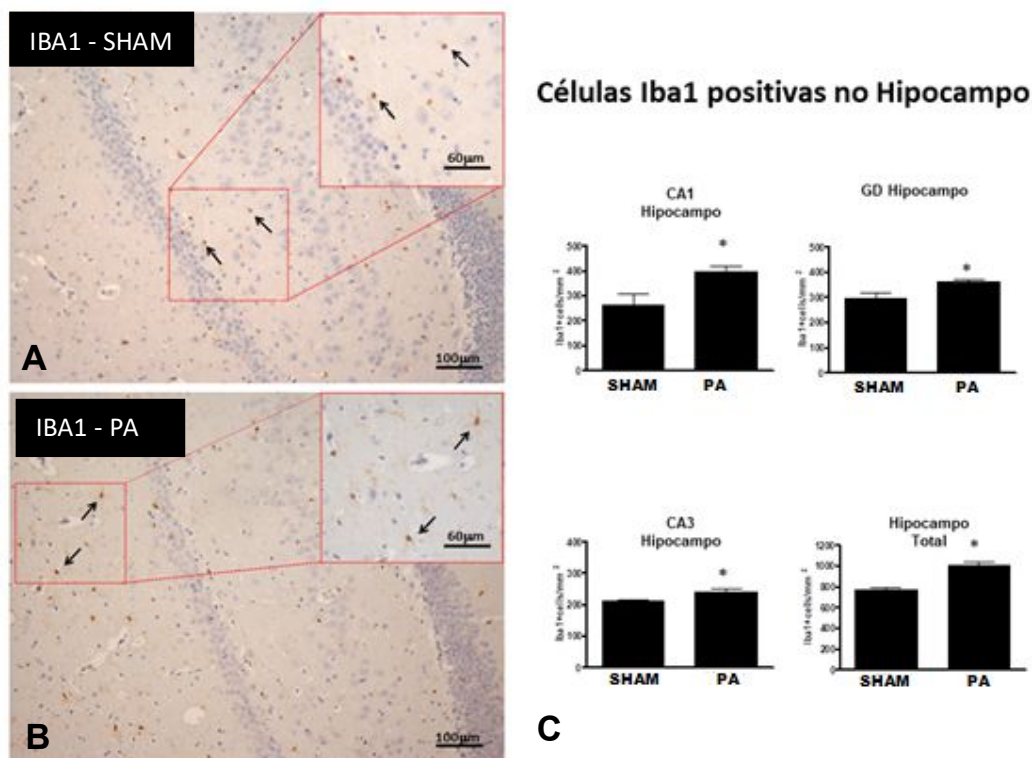
**Figura 17. Análise quantitativa por RT-PCR de mRNA de NGF no encéfalo de ratos dos grupos pancreatite aguda (PA) e Sham.** O gráfico mostra uma redução significativa dos níveis de mRNA de NGF no grupo PA (barra cinza) em comparação com o grupo Sham (barra preta). (\*  $P < 0,05$ ).



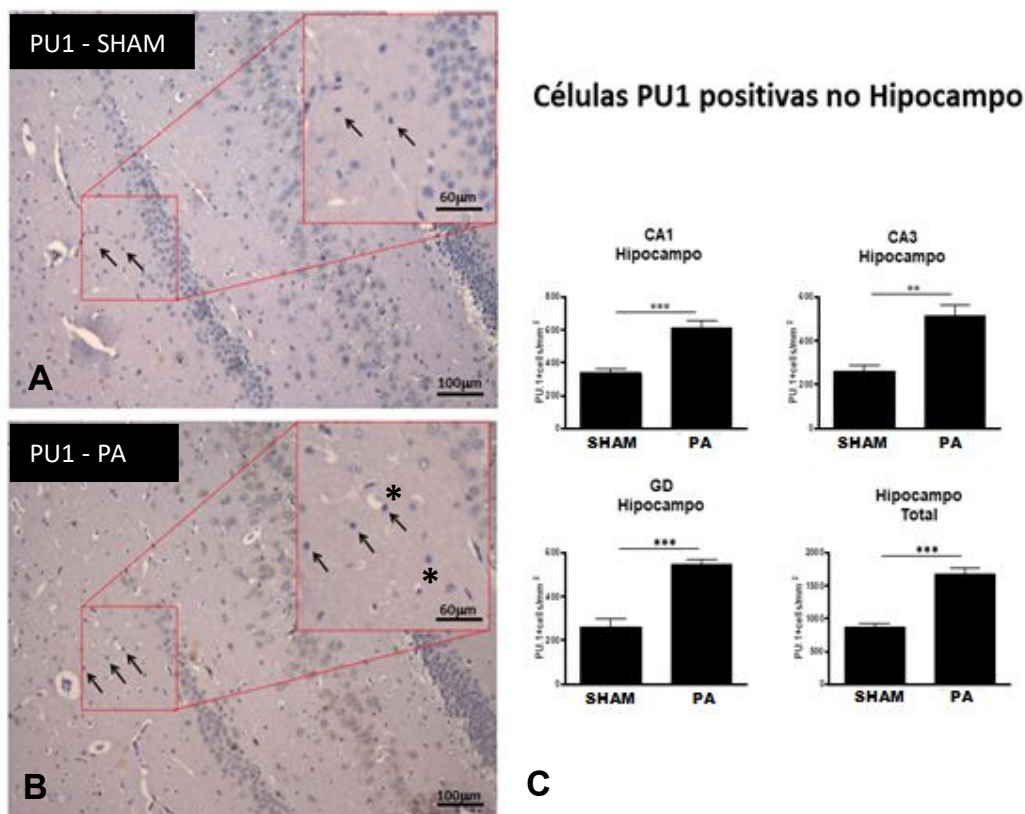
**Figura 18. Análise quantitativa por RT-PCR de mRNA de BDNF no encéfalo de ratos dos grupos pancreatite aguda (PA) e Sham.** O gráfico mostra um aumento significativo dos níveis de mRNA de BDNF no grupo PA (barra cinza) em comparação com o grupo Sham (barra preta). (\*  $P < 0,05$ ).

### **5.7 Análises Imuno-histoquímicas do hipocampo:**

O número de células Iba1<sup>+</sup> estava aumentado nas regiões CA1, CA3 e giro denteado (GD) do hipocampo dos animais do grupo PA quando comparado aos animais do grupo Sham (Figura 19A vs 19B e 19C). Não apenas o número de células microgliais (expressão de células Iba1<sup>+</sup>) foi maior em todo o hipocampo (Figura 19 A e B), mas também estavam com fenótipo modificado (Figura 19 A e B). Este achado foi confirmado pela análise da expressão de PU.1, um fator de transcrição expresso em células microgliais ativadas. Nossos resultados de ensaios de imunohistoquímica revelaram um aumento significativo na expressão de PU.1 no hipocampo do grupo PA, especialmente nas regiões CA1, CA3 e GD afetados por inflamação sistêmica em comparação aos animais do grupo Sham (Figura 20 A vs 20 B e 20 C).



**Figura 19. Identificação de células Iba1<sup>+</sup> em regiões do hipocampo de ratos dos grupo pancreatite aguda (PA) e Sham.** Um grande número de células Iba1<sup>+</sup> pode ser visto na região do giro dentado (DG) do hipocampo do grupo PA (setas em **B**) em comparação com o grupo Sham (setas em **A**). Células microgliais (células Iba1<sup>+</sup>) em grande número e com numerosos prolongamentos densos (setas em **B**), compatíveis com seu estado ativado, podem ser vistas no grupo PA (em maior detalhe no inserido em **B**). Em contraste, pouco ou nenhum prolongamento pode ser visto nas células microgliais do grupo Sham (em maior detalhe no inserido em **A**). O número de células Iba1<sup>+</sup> foi significativamente maior (\*  $P < 0,05$ ) nas regiões CA1, CA3, DG do hipocampo (c), bem como em todo o hipocampo do grupo PA (**C**). Barras em A e B = 100 $\mu$ m. Barras nos inseridos = 60 $\mu$ m.



**Figura 20. Identificação de células PU.1<sup>+</sup> em regiões do hipocampo de ratos dos grupo pancreatite aguda (PA) e Sham.** Um grande número de células PU.1<sup>+</sup> pode ser visto na região do giro denteado do hipocampo (DG) do grupo PA (setas em **B**) em comparação com o grupo controle (setas em **A**). Células PU.1<sup>+</sup> em grande número, com algumas localizadas próximas aos vasos sanguíneos (asterisco), podem ser vistas no grupo PA (em maior detalhe no inserido em **B**). Em contraste, poucas células PU.1<sup>+</sup> localizadas perto dos vasos sanguíneos podem ser vistas no grupo Sham (em maior detalhe no inserido em **A**). O número de células PU.1<sup>+</sup> foi significativamente maior (\*  $P < 0,05$ ) nas regiões CA1, CA3, DG do hipocampo, bem como no hipocampo total do grupo PA (**C**). Barras em A e B = 100• m. Barras nos inseridos = 60µm.

## 6. DISCUSSÃO:

A despeito dos inúmeros achados em relação à repercussão encefálica causada por doenças inflamatórias como (diabetes e artrite), doenças infecciosas (pneumonia e sepse) (44,50) não foi possível encontrarmos, em nossas bases de busca, artigos sobre os efeitos encefálicos causados pela inflamação sistêmica em decorrência de pancreatite aguda. Com base nessa premissa, nos propusemos a estudar alguns dos agentes imunoinflamatórios envolvidos no curso da PA e suas possíveis influências sobre o fenótipo da microglia. Previamente ao estabelecimento do nosso modelo de indução de PA, inúmeras tentativas foram realizadas com outros métodos descritos na literatura, tais como a injeção intraparenquimatosa do lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, o qual tem sido descrito como um potente indutor de inflamação (59). Os resultados desse protocolo não se mostraram satisfatórios, estando os principais parâmetros bioquímicos e histopatológicos abaixo do esperado em uma PA. Alternativamente, testamos um método de injeção intraparenquimatosa de um macerado de tecido pancreático de ratos doadores em pâncreas de ratos receptores. Os ratos submetidos a esse protocolo também não apresentaram qualquer parâmetro utilizado usualmente como indicador de PA. Por outro lado, o nosso modelo de ligadura da porção esplênica do pâncreas foi eficaz em induzir PA em ratos.

Este nosso método gerou alterações macroscópicas compatíveis com um quadro de PA em ratos, sendo observadas, no período de 48h, algumas lesões, tais como: edema, hemorragia e esteatonecrose. A presença de pancreatite foi corroborada após análise comparativa dos pâncreas dos animais do grupo PA com os do grupo Sham, sendo que neste caso os ratos apresentaram apenas um leve edema, como possível consequência de uma inflamação local. Além disso, os achados histopatológicos e a dosagem de amilase sérica reforçam a ocorrência de um quadro PA, demonstrando a eficácia do nosso método.

Em concordância com relatos anteriores da literatura sobre a histopatologia da PA em ratos, nossos achados histológicos confirmaram a presença de necrose parenquimatosa, esteatonecrose, focos de hemorragia e infiltrado inflamatório (1,6).

Até o momento, a maioria dos estudos abordando lesão pancreática concentram-se apenas no desenvolvimento de pancreatite causada por isquemia na região próxima à artéria esplênica, ou em porções maiores do pâncreas, enquanto no presente estudo foi realizada uma isquemia por ligadura em uma porção reduzida

do pâncreas, mais especificamente, na porção esplênica. Vale ressaltar que esta alteração tinha como objetivo induzir uma reação inflamatória leve e não, a comumente, grave (48,60,61), justificando a realização de ligadura em uma área menor e, por consequência, com menos comprometimento do tecido pancreático.

Após confirmação de indução de uma PA, procedeu-se às análises dos encéfalos dos ratos. As análises histopatológicas dos encéfalos não revelaram qualquer alteração significativa. Este nosso achado sugere que os efeitos encefálicos da PA sejam possivelmente discretos, em termos de citoarquitetura e arranjo tecidual, concentrando-se mais ao nível da ativação celular mediada por fatores humorais. Desta forma, é provável que não tenha ocorrido a morte maciça de neurônios e tampouco uma invasão substancial de células inflamatórias no parênquima encefálico. No entanto, mais estudos serão necessários a fim de que sejam verificados a integridade da BHE e também a possível presença de outras subpopulações de células inflamatórias através de marcadores fenotípicos.

Em nossos estudos também avaliamos os níveis de amilase sérica de forma a acrescentarmos mais evidências sobre o estabelecimento de um modelo de PA em ratos. Os níveis de amilase sérica permaneceram constantes no grupo Sham, mas elevaram-se significativamente nos animais do grupo PA. Esta análise é compatível com a observação de que níveis elevados de amilase sérica são encontrados nos modelos experimentais de PA leve, caracterizada por edema intersticial e número de morte celular (62). Após o início da pancreatite, o plasma sanguíneo apresenta altas concentrações de amilase, a qual é amplamente utilizada como marcador no diagnóstico de inflamação do pâncreas. Na literatura, o edema pancreático, apesar de não ser indicador de gravidade, demonstrou melhor correlação com os altos níveis de amilase, sendo que os parâmetros usuais para o diagnóstico de pancreatite grave, como necrose acinar, apresentam imprecisão em relação ao nível da amilase sérica (63).

A análise por RT-PCR, realizada a partir do tecido pancreático e encefálico, sugere que a indução de PA tem possível papel regulador nos níveis de inflamassomas (NLRP3 e Casp-1), citocinas (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e fatores neurotróficos (NGF e BDNF). Após análise molecular, a expressão de NLRP3 foi encontrada significativamente aumentada no pâncreas do grupo PA quando comparado ao grupo Sham. Níveis elevados de mRNA para caspase-1 também foram observados no pâncreas do grupo PA em comparação ao Sham. Levando-se em conta o papel amplamente conhecido deste mediadores sobre a inflamação tecidual, estes

resultados sugerem que o nosso modelo de pancreatite pode desencadear alterações sistêmicas, a partir do tecido pancreático, com possíveis desdobramentos para outros órgãos, como por exemplo, o encéfalo. O perfil das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  também foi avaliado através de ensaios de qRT-PCR do tecido pancreático. Os níveis de mRNA para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  foram semelhantes entre o grupo PA e o grupo Sham, não sendo observadas diferenças significativas no tempo de 48 horas após a indução de PA. Apesar de não termos detectado alterações significativas nos níveis de citocinas consideradas como moléculas-chave na fisiopatologia da pancreatite, algumas questões devem ser ponderadas sobre o nosso modelo de PA: i) não há como precisar se no caso de uma pancreatite leve, induzida por ligadura, ocorram danos teciduais suficientes para uma indução à produção dessas citocinas investigadas; ii) os tempos evolutivos testados em nosso estudo após indução de PA podem não estar sincronizados com o pico de liberação dessas citocinas, sendo necessárias outras avaliações com tempos curtos ou mais longos para melhor definição; iii) não se pode descartar a possível ocorrência de fatores contrarregulatórios responsáveis por uma inibição na produção dessas citocinas neste modelo de PA.

A fim de entendermos o impacto da resposta inflamatória sistêmica, induzida pela pancreatite aguda, sobre a homeostase do encéfalo, avaliamos os níveis de inflamassomas (NLRP3 e Casp-1) e o perfil das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  através de ensaios de qRT-PCR no tecido encefálico. O inflamassoma NLRP3 apresentou elevação nos níveis de mRNA no grupo PA em relação ao grupo Sham. Por outro lado, a PA não induziu qualquer alteração nos níveis de mRNA do inflamassoma Casp-1. Com relação à expressão de citocinas, constatamos que os níveis de mRNA de TNF- $\alpha$  foi significativamente maior no grupo PA em comparação aos do grupo Sham. Em contraste, os níveis de mRNA para IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  foram semelhantes entre o grupo PA e o grupo Sham, não sendo observadas diferenças significativas no tempo de 48 horas após a indução de PA. A não detecção no tecido encefálico de alterações nos níveis de mRNA para o inflamassoma Casp-1 e para as citocinas IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  pode estar relacionada aos mesmos fatores citados acima para o tecido pancreático. Deve-se ponderar que múltiplas vias regulatórias dependentes da gravidade, tempo evolutivo e da extensão da lesão podem alterar a expressão dessas moléculas. Desta forma, outras abordagens serão necessárias a



fim de testarmos a ocorrência deste e também de outros mediadores inflamatórios de forma mais conclusiva.

Em um estudo anterior, alguns membros do nosso grupo mostraram que fatores de crescimento tais como o NGF e o BDNF são capazes de modular o fenótipo da microglia após interação bacteriana (64). Em face disso, optamos por testar se os níveis de mRNA dessas moléculas estariam presentes após indução de PA. Os ensaios de RT-PCR revelaram altos níveis de mRNA do BDNF no encéfalo de ratos após inflamação sistêmica induzida por PA. Especulamos que estes níveis elevados de BDNF durante o processo inflamatório pancreático pode ser devido a um efeito neuroprotetor desta neurotrofina. Estudos recentes descreveram uma forte correlação entre os efeitos do BDNF e a imunomodulação no SNC. Além disso, níveis alterados de BDNF foram relatados no encéfalo e no plasma de pacientes com os mais variados tipos de distúrbios neurológicos (25). Apesar desses estudos, os mecanismos fisiopatológicos mediados pelo BDNF ainda são desconhecidos, e um maior número de relatos são necessários para melhor embasar essa correlação entre essa neurotrofina e a neuroinflamação.

Supreendentemente, a PA induziu um efeito oposto ao do BDNF nas análises do NGF. Os níveis de mRNA do NGF foram encontrados mais baixos no grupo PA. Esta redução nos níveis de NGF durante a indução de PA corrobora nossa hipótese de um efeito deletério da inflamação pancreática no SNC, considerando-se ainda que um estudo recente mostrou que o NGF é capaz de regular as atividades homeostáticas da micróglia no encéfalo (13). Este estudo aponta o NGF como um possível agente neuroprotetor durante o acúmulo da proteína A $\beta$ , tendo essa neurotrofina uma ação antiinflamatória direta sobre a microglia (13).

Em termos gerais, o presente estudo teve como objetivo fornecer algumas pistas sobre o impacto da PA na homeostase do SNC. Em particular, investigamos se a pancreatite poderia levar a um estado de neuroinflamação com repercussões no perfil de ativação da microglia. Não obstante, o tecido nervoso ainda seja considerado um sítio de privilégio imunológico, alguns autores têm mostrado que talvez essa proposição esteja equivocada em múltiplos aspectos, não funcionando exatamente da forma como foi estabelecida anteriormente (65). É amplamente conhecido que a permeabilidade da BHE não ocorre de maneira uniforme em todo encéfalo, sendo por isso um ponto-chave para a comunicação periférica e o SNC (65). Além disso, estudos anteriores mostraram que a microglia pode ser ativada,

após estimulação periférica pelo LPS, mesmo no encéfalo previamente saudável. Nesse caso, a inflamação sistêmica seguida a injeção do LPS foi capaz de ativar não apenas a microglia, mas também os astrócitos, em animais sem doença neurodegenerativa. Esta resposta inflamatória sistêmica pode levar a um episódio de indução patológica em pacientes afetados por inflamação periférica associada a altos níveis de TNF- $\alpha$  sérico (66).

Relatos anteriores mostram que o TNF- $\alpha$  desempenha um papel na inflamação periférica e em múltiplas disfunções cognitivas. Esse desequilíbrio patológico tem sido associado à progressão de doenças neurodegenerativas causada pelos níveis aumentados de TNF- $\alpha$  (66). Os nossos resultados revelaram níveis elevados de expressão do TNF- $\alpha$  no encéfalo dos ratos afetados pela pancreatite, sendo que este achado está em linha com estudos anteriores sobre “crosstalk” periférico e encéfalo. Além disso, o TNF- $\alpha$ , que desempenha um papel importante entre as citocinas pró-inflamatórias, sendo frequentemente relatado como envolvido no início da inflamação sistêmica (22). Embora a inflamação sistêmica pareça estar relacionada aos eventos iniciais da neuroinflamação, pouco ou nenhum relato foi feito sobre uma interferência direta do pâncreas na homeostase do SNC. No presente estudo, mostramos a indução de PA a partir de um procedimento cirúrgico e sem qualquer estímulo exógeno como o LPS. Ao que tudo indica, a pancreatite, induzida através do nosso método, foi capaz de levar a uma resposta inflamatória sistêmica. Nesse sentido, sugerimos que essa inflamação foi capaz de alterar a função da microglia, mudando a sua morfologia. Sendo que este efeito foi confirmado através da marcação de células Iba1<sup>+</sup> no hipocampo

Os microgliócitos são células essenciais na manutenção da homeostase do SNC, porém a sua ativação pode alterar a função ou mesmo a sobrevivência neuronal (14). Por conta disso, essas células desempenham um papel importante na fisiopatologia de diversas doenças neurodegenerativas e, de maneira geral, tornam-se ativadas por meio de moléculas e citocinas pró-inflamatórias (14,52,67,68). Após ativada, a microglia pode levar os neurônios à morte através de vias desencadeadas por meio de *stress* oxidativo. A microglia ativada pode ser detectada através do fator de transcrição conhecido como PU.1. O PU.1 tem sido associado a um perfil inflamatório em doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (14,49). Nestes trabalhos, os autores mostraram uma maior expressão de mRNA para o

PU.1 em animais afetados por doenças neurodegenerativas. Além disso, a inibição da via intracelular de PU.1 reduz a progressão da inflamação e também o número de neurônios mortos (14,49,59,64).

No presente estudo, mostramos uma expressão de PU.1 mais alta no hipocampo de animais com pancreatite, sendo este resultado compatível com as nossas marcações de Iba1. Ambas as expressões de Iba1 e PU.1 foram significativamente aumentadas nas regiões CA1, CA3 e GD, como também por todo o hipocampo dos animais do grupo PA. Estes resultados sugerem que a indução da pancreatite foi capaz de induzir a microglia ao seu fenótipo *priming* possivelmente através da estimulação de mediadores inflamatórios sistêmicos que atingiram o encéfalo por via humoral após o dano inicial a partir do pâncreas. Vale frisar, que o objetivo deste estudo foi induzir uma pancreatite leve o bastante de forma detectarmos alterações no encéfalo dos ratos, mais especificamente sobre o estado de ativação *priming* da microglia. Sob essa condição a microglia *priming* poderia tornar-se completamente ativada por ocasião de um segundo estímulo. Evidenciando a necessidade de uma atenção especial nas doenças e intervenções que atinjam o pâncreas, pois mesmo um dano leve nesse órgão poderiam levar a um condicionamento da microglia, tornando-a susceptível à ativação completa em segundo estímulo inflamatório sistêmico com potencial de alcançar o encéfalo.

Há diversos relatos na literatura mostrando que a microglia geralmente transforma-se no fenótipo completamente ativado após um segundo estímulo inflamatório. Neste estado, a microglia pode favorecer o desencadeamento de doença neurodegenerativas, através da indução de morte maciça de neurônios (52,67). Apesar dos inúmeros relatos correlacionando lesões periféricas (por exemplo, infecção pulmonar) e o posterior surgimento de doenças neurodegenerativas (52,67), ainda não foi possível encontrarmos, em nossas bases de busca, qualquer estudo que demonstre que este mesmo evento possa ocorrer após um episódio de pancreatite.

## 7. CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, os nossos resultados sugerem que a inflamação sistêmica induzida pela PA é capaz de levar a uma alteração morfológica da microglia e aumentar a sua população no encéfalo. Além disso, essa resposta inflamatória pode desencadear ações e reações da microglia, cujos efeitos precisam de mais investigações futuras.

## 8. REFERÊNCIAS:

1. Hammad AY, Ditillo M, Castanon L. Pancreatitis. Surg Clin North Am [Internet]. Surg Clin North Am; 2018.[cited 2021 Dec 14]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30243452/>
2. Raivich, G., Haas, S., Werner, A., Klein, MA, Kloss, C., & Kreutzberg, GW. Regulação dos receptores MSCF na microglia no sistema nervoso central de camundongos normais e feridos: Um estudo de imunofluorescência quantitativa usando microscopia a laser confocal [Internet]. The Journal of Comparative Neurology.1998.[cited 2021 Dec 14]. Available from: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980808\)395:3%3C342::AID-CNE6%3E3.0.CO;2-2](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1096-9861(19980808)395:3%3C342::AID-CNE6%3E3.0.CO;2-2)
3. Sasmono RT, Oceandy D, Pollard JW, Tong W, Pavli P, Wainwright BJ, et al. A macrophage colony-stimulating factor receptor–green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse [Internet]. American Society of Hematology; 2003.[cited 2021 Dec 14]. Available from: [www.tasq.uq.edu.au](http://www.tasq.uq.edu.au)
4. John M. Howard, Walter Hess. History of the Pancreas: Mysteries of a Hidden Organ [Internet]. Springer Science & Business Media; 2012 [cited 2021 Dec 14]. Available from: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=rILPBgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT24&dq=+Howard,+J.M,+Hess,+W.+Acute+Pancreatitis.+In+Howard,+J.M,+Hess,+W+History+of+the+pancreas+–+Mysteries+of+a+Hidden+Organ+–+Kluwer+Academic/Plenum+Publishers,+New+York&ots=bqw>
5. Yazdi AS, Drexler SK, Tschopp J. The Role of the Inflammasome in Nonmyeloid Cells. J Clin Immunol [Internet]. 2010 Jun 27 [cited 2021 Dec 15];30(5):623–7. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10875-010-9437-y>
6. Casillas J, Sleeman D, Ahualli J, Ruiz-Cordero R, Echenique A. Acute Pancreatitis (AP). Multidiscip Teach Atlas Pancreas [Internet]. 2016 [cited 2021 Dec 14];681. Available from: [/pmc/articles/PMC7120089/](http://pmc/articles/PMC7120089/)
7. Malleo G, Mazzone E, Siriwardena AK, Cuzzocrea S. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in acute pancreatitis: From biological basis to clinical evidence [Internet]. 2007 aug [cited 2021 Dec 14];28(2):130–40. Available from: [https://journals.lww.com/shockjournal/Fulltext/2007/08000/ROLE\\_OF\\_TUMOR\\_NECROSIS\\_FACTOR\\_\\_\\_IN\\_ACUTE.2.aspx](https://journals.lww.com/shockjournal/Fulltext/2007/08000/ROLE_OF_TUMOR_NECROSIS_FACTOR___IN_ACUTE.2.aspx)
8. Singhrao SK, Harding A, Simmons T, Robinson S, Kesavalu L, Crean S. Oral Inflammation, Tooth Loss, Risk Factors, and Association with Progression of Alzheimer's Disease. J Alzheimer's Dis. 2014 Jan 1;42(3):723–37.
9. van Gool WA, van de Beek D, Eikelenboom P. Systemic infection and delirium: when cytokines and acetylcholine collide. Lancet. Elsevier; 2010 Feb 27;375(9716):773–5.
10. Sadiq N, Gillani SW, Al Saeedy D, Rahmoun J, Shaban D, Kotait K, et al.

- Clinical review of acute, recurrent, and chronic pancreatitis: Recent updates of 2013–2019 literature [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2021 Dec 14];12(2):112. Available from: [/pmc/articles/PMC7373112/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30117106/)
11. Perry VH, Holmes C. Microglial priming in neurodegenerative disease [Internet]. 2014 Mar 18 [cited 2021 Dec 14];10(4):217–24. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrneurol.2014.38>
  12. Hegde A, Bhatia M. Neurogenic Inflammation in Acute Pancreatitis [Internet]. 2005 [cited 2021 Dec 14];6(5):417–21. Available from: <http://www.joplink.net>
  13. Lima Giacobbo B, Doorduyn J, Klein HC, Dierckx RAJO, Bromberg E, de Vries EFJ. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation [Internet]. 2019 May 1 [cited 2022 Jan 3];56(5):3295–312. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30117106/>
  14. Gomez-Cambronero LG, Sabater L, Pereda J, Cassinello N, Camps B, Vina J, et al. Role of Cytokines and Oxidative Stress in the Pathophysiology of Acute Pancreatitis: Therapeutical Implications. Bentham Science Publishers. 2005 Mar 25;1(4):393–403.
  15. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA [Internet]. 2009 Jan 21 [cited 2021 Dec 14];458(7237):509–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature07710>
  16. Perry VH, Nicoll JAR, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease [Internet]. 2010 Mar 16 [cited 2021 Dec 14];6(4):193–201. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrneurol.2010.17>
  17. Gullick HD. Relation of the magnitude of blood enzyme elevation to severity of exocrine pancreatic disease [Internet]. 1973 May [cited 2021 Dec 14];18(5):375–83. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01071986>
  18. Garg PK, Singh VP. Organ Failure Due to Systemic Injury in Acute Pancreatitis. Gastroenterology. W.B. Saunders. 2019 May 1;156(7):2008–23.
  19. Farrar MA, Schreiber RD. The Molecular Cell Biology of Interferon-gamma and its Receptor [Internet]. 2003 Nov 28 [cited 2021 Dec 14];11:571–611. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.iy.11.040193.003035>
  20. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases [Internet]. 2011 Apr 7 [cited 2021 Dec 14];117(14):3720–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21304099/>
  21. Steeland S, Libert C, Vandenbroucke RE. A New Venue of TNF Targeting [Internet]. 2018 May 11 [cited 2021 Dec 15];19(5):1442. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/5/1442/htm>
  22. Sredni-Kenigsbuch D. TH1/TH2 CYTOKINES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM [Internet]. 2009 [cited 2021 Dec 15];112(6):665–703. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00207450290025725>

23. Szelényi J. Cytokines and the central nervous system. Elsevier. 2001 Mar 1;54(4):329–38.
24. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. Cell Press. 2010 Mar 19;140(6):821–32.
25. Eyileten C, Sharif L, Wicik Z, Jakubik D, Jarosz-Popek J, Soplinska A, et al. The Relation of the Brain-Derived Neurotrophic Factor with MicroRNAs in Neurodegenerative Diseases and Ischemic Stroke [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Dec 14];58(1):329–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32944919/>
26. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes [Internet]. 2013 May 24 [cited 2021 Dec 14];13(6):397–411. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri3452>
27. Davis BK, Wen H, Ting JPY. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases [Internet]. 2011 Apr 23 [cited 2021 Dec 14];29:707–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21219188/>
28. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko D V. Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. Cell Press. 2013 Feb 21;38(2):209–23.
29. Sun C, Zhang F, Ge X, Yan T, Chen X, Shi X, et al. SIRT1 Improves Insulin Sensitivity under Insulin-Resistant Conditions by Repressing PTP1B. Cell Press. 2007 Oct 3;6(4):307–19.
30. Csak T, Ganz M, Pespisa J, Kodys K, Dolganiuc A, Szabo G. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells [Internet]. 2011 Jul [cited 2021 Dec 14];54(1):133–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21488066/>
31. Sun Q, Gao W, Loughran P, Shapiro R, Fan J, Billiar TR, et al. Caspase 1 activation is protective against hepatocyte cell death by up-regulating beclin 1 protein and mitochondrial autophagy in the setting of redox stress [Internet]. 2013 May 31 [cited 2021 Dec 14];288(22):15947–58. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820459800/fulltext>
32. Groß O, Yazdi AS, Thomas CJ, Masin M, Heinz LX, Guarda G, et al. Inflammasome Activators Induce Interleukin-1 $\alpha$  Secretion via Distinct Pathways with Differential Requirement for the Protease Function of Caspase-1. Cell Press. 2012 Mar 23;36(3):388–400.
33. Kang R, Lotze MT, Zeh HJ, Billiar TR, Tang D. Cell Death and DAMPs in Acute Pancreatitis [Internet]. 2014 Aug 5 [cited 2021 Dec 14];20(1):466–77. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.2119/molmed.2014.00117>
34. Holmes C, Butchart J. Systemic inflammation and Alzheimer's disease [Internet]. 2011 Aug 1 [cited 2021 Dec 14];39(4):898–901. Available from: </biochemsoctrans/article/39/4/898/65349/Systemic-inflammation-and-Alzheimer-s-disease>
35. Fujimoto K, Hosotani R, Wada M, Lee JU, Koshihara T, Miyamoto Y, et al. Ischemia–Reperfusion Injury on the Pancreas in Rats: Identification of Acinar

- Cell Apoptosis. Academic Press. 1997 Aug 1;71(2):127–36.
36. Chalkiadaki A, Guarente L. High-fat diet triggers inflammation-induced cleavage of SIRT1 in adipose tissue to promote metabolic dysfunction [Internet]. 2012 Aug 8 [cited 2021 Dec 14];16(2):180–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22883230/>
  37. BIASON-LAUBER A, BÖNI-SCHNETZLER M, HUBBARD BP, BOUZAKRI K, BRUNNER A, CAVELTI-WEDER C, et al. Identification of a SIRT1 mutation in a family with type 1 diabetes. Identif a SIRT1 Mutat a Fam with type 1 diabetes. 2013 Mar 5;17(3):448–55.
  38. Anderson ST, O'Callaghan EK, Commins S, Coogan AN. Does prior sepsis alter subsequent circadian and sickness behaviour response to lipopolysaccharide treatment in mice? [Internet]. 2013 Dec 15 [cited 2021 Dec 14];122(1):63–73. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00702-013-1124-8>
  39. Stienstra R, Joosten LAB, Koenen T, Van Tits B, Van Diepen JA, Van Den Berg SAA, et al. The Inflammasome-Mediated Caspase-1 Activation Controls Adipocyte Differentiation and Insulin Sensitivity. Cell Press; 2010 Dec 1;12(6):593–605.
  40. Shao W, Yeretssian G, Doiron K, Hussain SN, Saleh M. The caspase-1 digestome identifies the glycolysis pathway as a target during infection and septic shock [Internet]. 2007 Dec 14 [cited 2021 Dec 14];282(50):36321–9. Available from: <http://www.jbc.org/article/S002192581846084X/fulltext>
  41. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. Pergamon. 1990 Jan 1;39(1):151–70.
  42. Budni J, Bellettini-Santos T, Mina F, Garcez ML, Zugno AI. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease [Internet]. 2015 [cited 2021 Dec 14];6(5):331–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26425388/>
  43. Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration [Internet]. 2013 May [cited 2021 Dec 14];138(2):155–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23348013/>
  44. Perry VH, Cunningham C, Holmes C. Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration [Internet]. 2007 Jan 15 [cited 2021 Dec 14];7(2):161–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri2015>
  45. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Elsevier Current Trends; 1996 Aug 1;19(8):312–8.
  46. KONSMAN JP, PARNET P, DANTZER R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. Elsevier Current Trends; 2002 Mar 1;25(3):154–9.
  47. Helmut K, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia [Internet]. 2011 Apr [cited 2021 Dec 14];91(2):461–553. Available from:



<https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/physrev.00011.2010>

48. Allan SM, Rothwell NJ. Inflammation in central nervous system injury [Internet]. 2003 Oct 29 [cited 2021 Dec 14];358(1438):1669. Available from: [/pmc/articles/PMC1693261/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1693261/)
49. Gómez-Nicola D, Fransen NL, Suzzi S, Hugh Perry V. Regulation of Microglial Proliferation during Chronic Neurodegeneration [Internet]. 2013 Feb 6 [cited 2021 Dec 14];33(6):2481–93. Available from: <https://www.jneurosci.org/content/33/6/2481>
50. Perry VH, Newman TA, Cunningham C. The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease [Internet]. 2003 [cited 2021 Dec 14];4(2):103–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrn1032>
51. Perry VH. Contribution of systemic inflammation to chronic neurodegeneration [Internet]. 2010 Jul 20 [cited 2021 Dec 14];120(3):277–86. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00401-010-0722-x>
52. Makhija R, Kingsnorth AN. Cytokine storm in acute pancreatitis [Internet]. 2002 [cited 2021 Dec 14];9(4):401–10. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s005340200049>
53. Lebreton F, Berishvili E, Parnaud G, Rouget C, Bosco D, Berney T, et al. NLRP3 inflammasome is expressed and regulated in human islets [Internet]. 2018 Jun 25 [cited 2021 Dec 14];9(7):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-018-0764-x>
54. Keller M, Rüegg A, Werner S, Beer HD. Active Caspase-1 Is a Regulator of Unconventional Protein Secretion. *Cell Press*; 2008 Mar 7;132(5):818–31.
55. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell Press*; 2010 Mar 19;140(6):805–20.
56. Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Woolford J, Dean C, Kerr S, et al. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease [Internet]. 2009 Sep 8 [cited 2021 Dec 14];73(10):768–74. Available from: <https://n.neurology.org/content/73/10/768>
57. Satoh K, Shimosegawa T, Masamune A, Hirota M, Kikuta K, Kihara Y, et al. Nationwide epidemiological survey of acute pancreatitis in Japan [Internet]. 2011 May [cited 2021 Dec 14];40(4):503–7. Available from: [https://journals.lww.com/pancreasjournal/Fulltext/2011/05000/Nationwide\\_Epidemiological\\_Survey\\_of\\_Acute.2.aspx](https://journals.lww.com/pancreasjournal/Fulltext/2011/05000/Nationwide_Epidemiological_Survey_of_Acute.2.aspx)
58. Eulálio JMR, Bon-Habib ACC, de Oliveira Soares D, Corrêa PGA, Pineschi GPF, Diniz VS, et al. Critical analysis and systematization of rat pancreatectomy terminology [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2021 Dec 14];31(10):698–704. Available from: <http://www.scielo.br/j/acb/a/kZ4VX5MVNswL73Z3nwL6JbM/?lang=en>
59. Pyter LM, El Mouatassim Bih S, Sattar H, Prendergast BJ. Peripheral tumors alter neuroinflammatory responses to lipopolysaccharide in female rats. *Elsevier*; 2014 Mar 13;1552:55–63.

60. Erion JR, Wosiski-Kuhn M, Dey A, Hao S, Davis CL, Pollock NK, et al. Obesity elicits interleukin 1-mediated deficits in hippocampal synaptic plasticity [Internet]. 2014 [cited 2021 Dec 14];34(7):2618–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24523551/>
61. Ferrero-Andrés A, Panisello-Roselló A, Roselló-Catafau J, Folch-Puy E. NLRP3 Inflammasome-Mediated Inflammation in Acute Pancreatitis [Internet]. 2020 Jul 29 [cited 2021 Dec 14];21(15):5386. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/15/5386/htm>
62. Gomez-Nicola D, Perry VH. Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: A paradigm of functional plasticity [Internet]. 2015 Apr 19 [cited 2021 Dec 14];21(2):169–84. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1073858414530512>
63. Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS [Internet]. 2014 Aug 6 [cited 2021 Dec 14];514(7521):187–92. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature13683>
64. Pöyhönen S, Er S, Domanskyi A, Airavaara M. Effects of neurotrophic factors in glial cells in the central nervous system: Expression and properties in neurodegeneration and injury. *Frontiers Media S.A.*. 2019;10(APR):486.
65. Olmos G, Lladó J. Tumor necrosis factor alpha: A link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm.* Hindawi Publishing Corporation. 2014;2014.
66. Hoogerwerf WA, Shenoy M, Winston JH, Xiao SY, He Z, Pasricha PJ. Trypsin mediates nociception via the proteinase-activated receptor 2: A potentially novel role in pancreatic pain. *Gastroenterology.* W.B. Saunders. 2004 Sep 1;127(3):883–91.
67. Peery AF, Dellon ES, Lund J, Crockett SD, McGowan CE, Bulsiewicz WJ, et al. Burden of Gastrointestinal Disease in the United States: 2012 Update. *Gastroenterology.* W.B. Saunders. 2012 Nov 1;143(5):1179–1187.e3.
68. Fusco R, Siracusa R, Genovese T, Cuzzocrea S, Paola R Di. Focus on the Role of NLRP3 Inflammasome in Diseases [Internet]. 2020 Jun 13 [cited 2021 Dec 14];21(12):4223. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/12/4223/htm>

## 9. ANEXO 1



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ**  
**Centro de Ciências da Saúde - CCS**

Rio de Janeiro, 15 de maio de 2017

Prezado Professor Wagner Baetas da Cruz

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: **“Repercussões Neuroencefálicas da Pancreatite Aguda: Efeito da Inflamação Sistêmica Sobre a Ativação e Proliferação Microglial.”, protocolo nº 018/17**, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia **25/04/2017**.

<b>Finalidade</b>	<b>( ) Ensino (X) Pesquisa Científica</b>
<b>Vigência do Projeto</b>	<b>Até 15/12/2018</b>
<b>Espécie/linhagem</b>	<b><i>Rattus norvegicus</i>/ Wistar</b>
<b>Nº de animais</b>	<b>32 animais</b>
<b>Peso/idade</b>	<b>250g / 6 meses</b>
<b>Sexo</b>	<b>Machos e fêmeas</b>
<b>Origem</b>	<b>Biotério de Criação do Centro de Cirurgia Experimental da UFRJ - CCS bloco J , 2º andar, sala 32.</b>

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat  
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS

*Decania do CCS: Av. Carlos Chagas Filho, 373 Prédio do Centro de Ciências da Saúde, Bloco K, 2º andar -  
 Cidade Universitária - CEP 21941-590 – Rio de Janeiro – Brasil  
 Tel: (21) 2562.6705 - Fax: (21) 2270.1749 - www.ccsdecania.ufrj.br*