
Expressão gênica de marcadores inflamatórios de pancreatite alcoólica crônica em ratos com suplementação de vitamina E

Inflammatory markers gene expression in alcoholic chronic pancreatitis in vitamin E supplemented rats

Thaís Helena Monteiro¹, Hélio Vannucchi², Tatiana Elias Colombo¹

¹Curso de Biomedicina da Universidade Paulista, São José do Rio Preto - SP, Brasil; ²Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-SP, Brasil.

Resumo

Objetivo – Avaliar o efeito da suplementação com vitamina E sobre a expressão gênica pancreática de marcadores inflamatórios em ratos com pancreatite alcoólica crônica. **Métodos** – Ratos Wistar divididos em 3 grupos: controle, pancreatite alcoólica crônica sem suplementação de vitamina E e pancreatite alcoólica crônica com suplementação de vitamina E. A pancreatite foi induzida pela dieta líquida contendo etanol, ciclosporina A (via subcutânea) e ceruleína (via intraperitoneal). Foram dosados α -tocoferol no plasma e fígado e analisada a histopatologia do pâncreas. A expressão gênica dos marcadores inflamatórios COX-2, α -SMA, TNF- α e Pap foram obtidas por PCR em tempo real, pelo método SYBR Green. **Resultados** – A suplementação de vitamina E diminuiu o número de transcritos dos genes pró-inflamatórios COX-2, α -SMA e TNF- α e aumentou do gene Pap, considerado um componente importante do mecanismo de defesa contra a injúria pancreática. **Conclusão** – A suplementação com vitamina E demonstrou efeitos anti-inflamatórios benéficos na expressão gênica pancreática de marcadores inflamatórios em ratos com pancreatite alcoólica crônica, ratificando sua participação nos mecanismos de modulação da resposta inflamatória no pâncreas.

Descritores: Pancreatite alcoólica; Vitamina E; Expressão gênica; PCR

Abstract

Objective – To evaluate vitamin E supplementation effect on pancreatic gene expression of inflammatory markers in rats with alcoholic chronic pancreatitis. **Methods** – Wistar rats were divided in 3 groups: control, alcoholic chronic pancreatitis without vitamin E supplementation and alcoholic chronic pancreatitis with vitamin E supplementation. Pancreatitis was induced by liquid diet containing ethanol, cyclosporin A (subcutaneously) and cerulean (intraperitoneally). α -tocopherol content in plasma and liver and pancreas histopathology were analyzed. Gene expression of COX-2, α -SMA, TNF- α e Pap inflammatory biomarkers were analyzed through the quantitative real time PCR technique, by SYBR Green method. **Results** – Vitamin E supplementation decreased the transcripts number for COX-2, α -SMA, TNF- α genes and increased for Pap gene, an important defense mechanism component against pancreatic injury. **Conclusions** – Vitamin E supplementation showed anti-inflammatory and beneficial effects on pancreatic gene expression of some inflammation biomarkers in rats with alcoholic chronic pancreatitis, confirming its participation in the inflammatory response mechanisms in the pancreas.

Descriptors: Alcoholic pancreatitis; Vitamin E; Gene expression; PCR

Introdução

O alcoolismo consiste em um dos maiores fatores etiológicos e de risco na patogênese da pancreatite^{1,2}. Um dos mecanismos relacionados com a patogênese da pancreatite alcoólica é a sensibilização das células acinares à ativação intracelular prematura de zimógenos (enzimas inativas sintetizadas pelo pâncreas)^{3,4}. Embora o etanol não apresente um efeito direto na ativação de zimógenos, ele potencializa o efeito da colecistocinina (CCK)⁵. Em condições normais, este hormônio, produzido pelas células duodenais, estimula a secreção das pró-enzimas proteolíticas pelo pâncreas. Contudo, sob o estímulo do etanol, a CCK pode desencadear a ativação intracelular de zimógenos ocasionando a autodigestão do órgão⁴.

Uma baixa porcentagem de humanos alcoólicos desenvolve patologias no pâncreas, porém, inúmeros estudos têm indicado que a pancreatite não ocorre em modelos animais. Há, no entanto comprometimento da função pancreática exócrina⁶, aumento na expressão gênica do pâncreas após administração de etanol⁷⁻⁸ e diminuição na expressão de Pap (*pancreatitis associated*

protein) (proteína com função protetora contra a injúria pancreática) após oito semanas de consumo de etanol⁹. Gukovsky *et al.* (2008) também não encontraram indução de pancreatite em animais após 8 semanas de tratamento isolado com etanol e dieta hipolipídica, porém ao injetarem ciclosporina A (CsA), um imunossupressor, a partir da 7ª semana de tratamento e ceruleína (Cer), um análogo da colecistocinina, no início da 8ª semana de tratamento desses animais, conseguiram induzir a pancreatite¹⁰.

Na injúria pancreática, ocorre considerável alteração na atividade de alguns marcadores inflamatórios, por exemplo, aumento na expressão da ciclooxigenase e TNF- α ¹¹, assim como ativação da proteína alfa actina (α -SMA), dando início ao processo de fibrose¹².

O consumo de etanol também produz modificações no estado antioxidante do organismo. Estudos em modelos animais demonstram que a deficiência de vitamina E decorrente da baixa ingestão dietética ou do alcoolismo crônico leva a um aumento nas reações de lipoperoxidação¹³. Dentre os oito homólogos naturais da vitamina E, o α -tocoferol é o mais biologicamente

ativo, sendo considerado o mais potente antioxidante de característica lipossolúvel, responsável pela proteção de ácidos graxos poliinsaturados de membranas contra a peroxidação lipídica¹⁴. A ingestão de vitamina E acima da recomendação por alimentos ou suplementos está envolvida com a modulação do sistema imune e de interações das células inflamatórias com tecidos-alvo por meio de vários mecanismos¹⁵⁻¹⁶.

Segundo Azzi *et al.* (2004), o α -tocoferol está envolvido na modulação de duas das principais vias de transdução de sinal centradas na proteína C quinase e fosfatidilinositol-3-quinase, as quais participam na regulação de vários fatores de transcrição, como NF- κ B¹⁷. Dessa forma, considerando-se o efeito da vitamina E nessas duas enzimas quinases, alguns genes podem ser regulados pelo tocoferol: genes envolvidos no consumo e degradação de tocoferóis (proteína de transferência de α -tocoferol, citocromo P450 e glutatona-S-transferase), genes envolvidos na modulação de proteínas extracelulares (1- α -colágeno), genes conectados à inflamação e adesão e genes implicados na sinalização e na regulação do ciclo celular.

Diante deste contexto, pesquisas adicionais sobre genes de interesse poderão revelar novos aspectos sobre os mecanismos de ação envolvidos na injúria pancreática induzida pelo álcool e auxiliarão no delineamento de novas alternativas terapêuticas.

Esse trabalho propõe a hipótese de que a vitamina E, em doses suplementares, pode modular a resposta inflamatória no pâncreas de ratos com pancreatite alcoólica crônica (PAC), por meio da supressão de alguns genes pró-inflamatórios e estimulação de outros anti-inflamatórios, resultando em possível estratégia elucidativa dos mecanismos envolvidos com a injúria pancreática crônica decorrente do alcoolismo.

Métodos

Animais e dietas

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, protocolo nº 005/2009. Nesse trabalho, foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, com peso médio de 125g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Estes animais foram separados em 3 grupos (n = 10 animais/grupo), recebendo durante oito semanas, as respectivas dietas líquidas, conforme Lieber & DeCarli¹⁸ (1989), com alterações nas quantidades de α -tocoferol: grupo 1 (dieta controle), grupo 2 (dieta contendo etanol) e grupo 3 (dieta contendo etanol suplementada com vitamina E).

As dietas foram diariamente preparadas e oferecidas aos animais. Todas as dietas dos 3 grupos possuíam a mesma densidade calórica de 1,0 kcal/mL. Do total das calorias da sacarose, foi descontada a quantidade de amido utilizada como espessante. Grupos 2 e 3 possuíam 15% do valor calórico total (VCT) de proteína,

35% VCT de gordura, 14% VCT de carboidrato e 36% VCT de etanol. Grupo 1 possuía 15% VCT de proteína, 35% VCT de gordura e 50% VCT de carboidrato. Conforme Siqueira-Silva¹⁹ (2010), a quantidade de vitamina E nas dietas suplementadas foi de vinte vezes a quantidade recomendada para ratos (30mg ou 44,70 UI de acetato de alfa-tocoferol por Kg de dieta)²⁰.

A quantidade de etanol na dieta dos grupos 2 e 3 foi baseada em estudos anteriores com ratos^{10,18}. Os animais passaram por um período de três dias de adaptação ao ambiente, e um período de uma semana de adaptação às suas respectivas dietas, sendo que o etanol foi gradativamente introduzido na dieta dos grupos 2 e 3 na seguinte proporção: do primeiro ao terceiro dia, a dieta possuía 10% de etanol; do quarto ao sexto dia, 25%; e a partir do sétimo dia até o final do período experimental, 35%.

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

Durante o período experimental, os animais foram pesados semanalmente e a ingestão dietética medida diariamente. As condições de temperatura (25°C) e o ciclo claro-escuro de 12 horas foram mantidos. A partir do início da sétima semana do período experimental, os ratos receberam ciclosporina A (CsA) via subcutânea na dose de 20 mg/kg uma vez ao dia, ou o mesmo volume de veículo nos grupos controle, até o final da oitava semana.

Após uma semana do início da CsA, ou seja, no primeiro dia da oitava semana, a pancreatite foi induzida por meio de quatro injeções, a cada hora, de ceruleína (Cer) via peritoneal na dose de 20 μ g/kg ou solução salina no grupo controle. O tecido pancreático foi analisado uma semana após a indução da injúria, ao final da oitava semana do período experimental.

Tabela 1. Composição das dietas líquidas para os ratos (Lieber & DeCarli, 1989).

Ingredientes/Animais	G1(g/L)	G2 (g/L)	G3 (g/L)
Amido de Milho	16,0	16,0	16,0
Caseína*	41,4	41,4	41,4
Cistina	0,50	0,50	0,50
Metionina	0,30	0,30	0,30
Sacarose	111,30	21,30	21,30
Óleo de soja	38,88	38,88	38,88
Mistura Mineral	8,75	8,75	8,75
Mistura Vitamínica	2,5	2,5	2,5
Vitamina E (Suplemento)	—	—	0,6
Cloreto de Colina (0,2%)	0,25	0,25	0,25
Sorbato de potássio	3,50	3,50	3,50
Etanol	—	50	50

* equivalente a 37,50g de proteína

Ao término do período experimental, todos os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação e o pâncreas utilizado para análise histopatológica e extração do RNA total para análise da expressão gênica.

Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores usados na amplificação por PCR

Nome do gene	No de acesso no GenBank	Oligonucleotídeos Iniciadores	Produto esperado (pb)
COX-2	NM_017232.2	S: CCAGTATCAGAACCGCATTG AS: TGAGCAAGTCCGTGTTCAAG	150
α -SMA	NM_031004.2	S: AGGGAGTGATGGTTGGAATG AS: GATGATGCCGTGTTCTATCG	107
TNF- α	NM_012675.2	S: TCTTCTATTCTGCTCGTG AS: TTGGGAACTTCTCCTCCTTG	93
Pap	NM_053289.1	S: CTGGTTTGATGCAGAACTGG AS: GTGTTCTTGACCATGGATGC	105
18S	X01117	S: GAGCGGTGGCGTCCCCCAAC AS: GCGCGTGCAGCCCCGACATC	107

S: sense (forward primer); AS: antisense (reverse primer); COX-2: ciclooxigenase 2; α -SMA: smooth muscle alpha-actin; TNF- α : fator de necrose tumoral α ; Pap: pancreatitis-associated protein; 18S: RNA 18S ribossomal. RIBEIRÃO PRETO, 2009

Análise Histopatológica do Pâncreas

Fragmentos de tecido pancreático incluídos em parafina foram cortados (espessura de 4 μ m) e corados com HE (Hematoxilina de Harris e Eosina), com a finalidade de verificar a presença de dano pancreático através da análise morfológica do tecido, utilizando um microscópio óptico convencional (aumento de 400x).

Dosagem de Vitamina E (α -tocoferol) em Plasma e Fígado

As amostras de sangue foram coletadas em tubos plásticos estéreis, contendo EDTA. O sangue total foi processado no prazo de 2 horas, sob refrigeração, sendo centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm, à temperatura ambiente, para separação do plasma. Em 300 μ L de plasma, foram adicionados 600 μ L de etanol absoluto, agitando-se por 1 minuto. Em seguida, foram acrescentados 600 μ L de N-hexano, com posterior agitação por 1 minuto. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3.000 rpm, retirando-se uma alíquota de 300 μ L da fase orgânica. Esta alíquota foi submetida a secagem em fluxo de nitrogênio gasoso e resuspendida em 300 μ L de fase móvel, dos quais 20 μ L foram injetados no sistema de HPLC. As concentrações de α -tocoferol foram calculadas utilizando-se uma curva de calibração construída por meio de padrão externo de α -tocoferol (Sigma), sendo os resultados expressos em μ mols/L de plasma.

Amostras de fígado de aproximadamente 200 mg foram maceradas com 1 mL de etanol absoluto com o auxílio de um Potter. Em seguida, foi acrescentado 1 mL de N-hexano ao homogenato, agitando-se por aproximadamente 1 minuto. Este passo foi repetido mais duas vezes, com posterior reunião das fases hexânicas. Foi retirada uma alíquota de 300 μ L, evaporada em fluxo de N₂(g) e, posteriormente, suspensa em 300 μ L de fase móvel, dos quais 20 μ L foram injetados no sistema de HPLC. As concentrações de α -tocoferol foram calculadas utilizando-se uma curva de calibração construída por meio de padrão externo de α -tocoferol (Sigma), sendo os resultados expressos em nmols/g de fígado.

Extração de RNA Total

Após a retirada do órgão, o tecido pancreático foi imediatamente armazenado em solução estabilizadora de RNA (RNA later[®] – Qiagen) a 4°C por um mínimo de 24 horas e máximo de 30 dias, para posterior extração do RNA total. O RNA total foi extraído a partir de 10 mg de tecido pancreático de ratos dos diferentes grupos em estudo, utilizando 1,0 mL de Trizol LS (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) conforme as recomendações do fabricante. A integridade do RNA total foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro, medindo-se a absorvância em contraste com uma amostra de água, nos comprimentos de onda de 260 e 280nm.

PCR em Tempo Real

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 μ g de RNA total do pâncreas de ratos dos diferentes grupos em estudo, na presença de transcriptase reversa e do iniciador oligo (dt), conforme instruções do fabricante (High Capacity, ABI).

Para análise da expressão gênica dos transcritos que codificam para os marcadores inflamatórios (COX-2, α -SMA, TNF- α , Pap), foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores específicos visando a amplificação de toda a matriz de leitura aberta (ORF – Open Reading Frame) (Tabela 2).

As reações de RT-PCR em tempo real foram analisadas pelo método SYBR Green, em um aparelho ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). Os níveis relativos de transcritos foram determinados utilizando-se 18S RNA ribossomal como o gene de controle endógeno. As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50°C por 2 minutos, seguida pela ativação da DNA polimerase a 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos intercalados com anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. As reações foram preparadas em duplicata.

Análise Estatística

As diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando a análise de variância one-way (Teste de Tukey).

Para admitir diferenças estatisticamente significativas, foi considerado $P < 0,05$.

Resultados

Não houve diferença na ingestão total e diária de dieta líquida entre os três grupos, bem como na ingestão total e diária de etanol entre G2 e G3 ($p > 0,05$), mesmo quando os valores foram normalizados por grama de peso corporal (Tabela 3).

Não houve diferença na média de evolução do peso corporal dos animais ao longo de todo o período experimental, bem como no ganho total de peso corporal ao final da 6ª semana de tratamento.

Tabela 3. Ganho de peso total e ingestão total, diária e normalizada por grama de peso corporal (Pcorp) de dieta líquida (mL), alfa-tocoferol (mg) e etanol (mL) nos grupos (G1: sem tratamento, G2: dieta com etanol, G3: dieta com etanol + vitamina E) durante período experimental

	G1	G2	G3
Peso total (g)	122,7 (10,8)	114,5 (19,1)	111,0 (9,9)
Dieta líquida			
Total (mL)	3196,83 (78,4)	3153,75 (136,4)	3106,44 (89,4)
Diária (mL)	66,60 (1,6)	65,70 (2,8)	64,72 (1,9)
Total/P _{corp} (mL/g)	12,3 (0,55)	13,4 (1,00)	13,8 (1,81)
α-tocoferol			
Total (mg)	146,67 (0,4)	144,69 (0,5)	2355,86 (7,5)*
Diária (mg)	3,06 (0,4)	3,01 (0,5)	49,08 (7,5)*
Total/P _{corp} (mg/g)	0,6 (0,03)	0,6 (0,05)	10,5 (1,37)*
Etanol			
Total (mL)	–	157,69 (0,5)	155,32 (0,5)
Diária (mL)	–	3,29 (0,5)	–
Total/P _{corp} (mL/g)	–	0,67 (0,05)	–

Os valores estão representados como média (erro padrão da média). Pair-fed dos animais de G1 e G3 com G2. Para admitir diferenças estatisticamente significativas foi considerado $p < 0,05$. * $p < 0,01$ em relação a G1 e G2 (ANOVA) (RIBEIRÃO PRETO, 2009).

O pâncreas dos animais do G1 mostrou histologia normal (Figura 1). Já em G2 e G3 evidenciaram-se focos

Tabela 4. Níveis plasmáticos e hepáticos de α-tocoferol

	G1	G2	G3
Plasma (μmols/L)	14,27 (1,5)	21,64 (3,0)	43,91 (6,1)*
Fígado (nmols/g)	125,47 (18,5)	126,54 (10,5)	1595,90 (802,7)*

Os valores estão representados como média (erro padrão da média). Para admitir diferenças estatisticamente significativas foi considerado $p < 0,05$. * $p < 0,01$ (RIBEIRÃO PRETO, 2009).

Tabela 5. Quantidade relativa dos transcritos em estudo, após amplificação por RT-qPCR

Nome do gene	G1	G2/G1	G3/G1	G3/G2
COX-2	1	12,2 (3,7)*	3,7 (1,1)*	– 3,5 (1,1)*
α-SMA	1	25,5 (12,3)*	12,8 (5,4)*	– 2,2 (1,0)*
TNF-α	–	1	–	– 2,9 (1,0)*
Pap	1	92,4 (17,7)*	409,7 (170,9)*	4,5 (1,9)*

G1: Grupo 1; G2: Grupo 2; G3: Grupo 3. COX-2: ciclooxigenase 2; α-SMA: smooth muscle alpha-actin; TNF-α: fator de necrose tumoral α; Pap: pancreatitis-associated protein. Os valores estão representados como média (erro padrão da média). Para admitir diferenças estatisticamente significativas foi considerado $p < 0,05$. * $p < 0,01$ (ANOVA). RIBEIRÃO PRETO, 2009.

de destruição tecidual de leve a moderada e presença de infiltrado inflamatório de células mononucleares (entre as quais linfócito e plasmócito) (Figura 1). Houve confirmação da lesão ainda em estágios iniciais de PAC, particularmente na parte exócrina do pâncreas.

Os níveis tanto plasmáticos quanto hepáticos de α-tocoferol foram maiores no grupo que recebeu suplementação com vitamina E ($p < 0,01$) (Tabela 4).

Neste estudo, foi utilizada a metodologia da quantificação relativa por PCR em tempo real. Dessa forma, para melhor análise de um possível efeito relacionado à vitamina E, foram utilizados dois grupos como calibradores, os grupos 1 e 2. Considerando-se o grupo 1 como calibrador, a análise relativa de G2/G1 expressa o número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (–) expresso no grupo 2 em relação ao grupo 1; a análise relativa de G3/G1 expressa o número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (–) expresso no grupo 3 em relação ao grupo 1. Considerando-se o grupo 2 como calibrador, a análise relativa de G3/G2 expressa o número de vezes que o gene é mais (+) ou menos (–) expresso no grupo 3 em relação ao grupo 2, sendo que ambos os grupos possuem a indução da PAC, com o único diferencial da suplementação de vitamina E no grupo 3.

A suplementação com vitamina E na PAC diminuiu a quantidade de transcritos para os genes COX-2, α-SMA e TNF-α ($p < 0,01$) e aumentou para Pap ($p < 0,01$). COX-2 é aproximadamente 3,5 vezes menos expresso em G3 (PAC + vitamina E) em relação a G2 (PAC); α-SMA, 2,2 vezes menos expresso; TNF-α, 2,9 vezes menos expresso; e Pap, 4,5 vezes mais expresso ($p < 0,01$) (Tabela 5).

Discussão

O ganho de peso e a ingestão da dieta não apresentaram diferenças entre os três grupos experimentais, garantindo iguais condições de crescimento e desenvolvimento aos animais. A ingestão de etanol foi igual entre G2 e G3, e como as doses de CsA e de Cer administradas. Os animais dos grupos 2 e 3 foram submetidos às mesmas condições para o desenvolvimento da PAC.

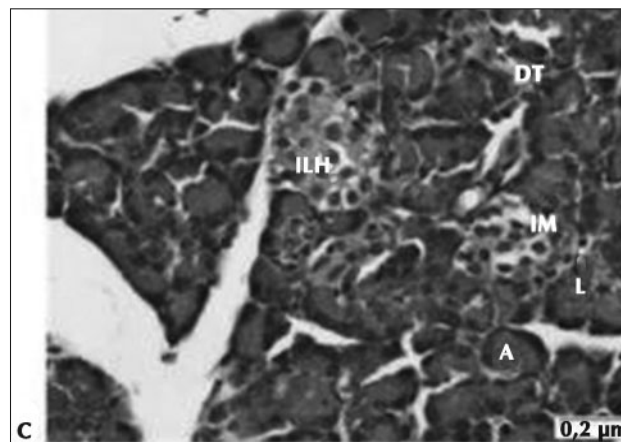
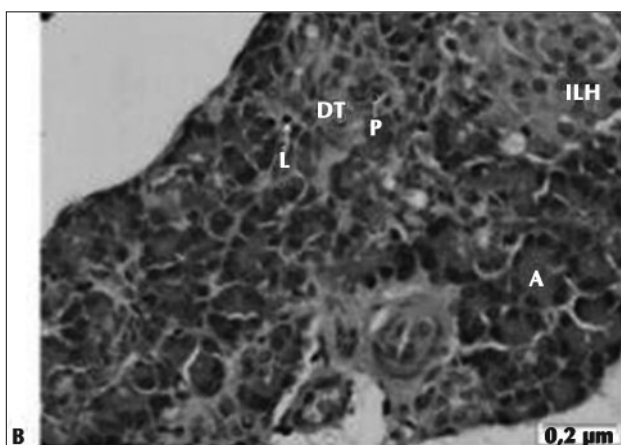
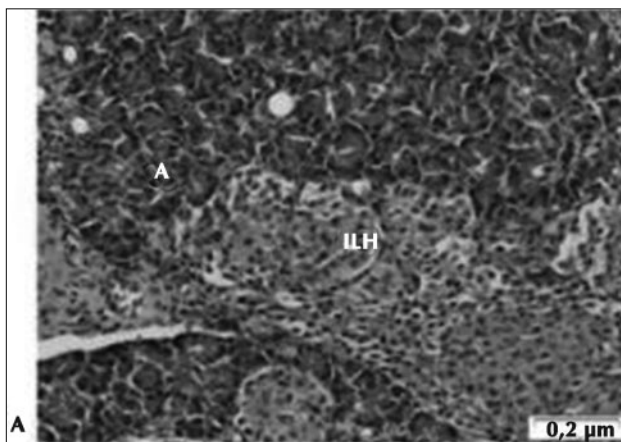


Figura 1. Análise histopatológica do tecido pancreático. (A): Grupo 1 (Controle): parênquima pancreático normal, x200. (B): Grupo 2 (Pancreatite alcoólica crônica): inflamação crônica focal, x400. (C): Grupo 3 (Pancreatite alcoólica crônica + Vitamina E): inflamação crônica focal, x400. Coloração HE,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

A análise histopatológica do tecido pancreático mostrou focos de destruição das células acinares de leve a moderada e infiltrado inflamatório de células mononucleares (linfócitos e plasmócitos), comprovando a indução da PAC, porém ainda em estágio bastante inicial. O desenvolvimento da pancreatite mostrou-se qualitativamente semelhante em G2 e G3, independente da suplementação com vitamina E. No trabalho de Gukovsky *et al.*¹⁰, a indução da PAC, também por meio das mesmas doses de CsA e de Cer, e mesma dieta proposta por Lieber e Decarli¹⁸, resultou em achado histopatológico mais avançado, com perda de aproximadamente 90% de células acinares e presença de fibrose¹⁰. É provável que o tempo de tratamento tenha interferido com o tipo de resposta do tecido pancreático, pois neste trabalho o período de dieta foi 2 semanas mais curto em relação ao trabalho de Gukovsky *et al.*¹⁰.

Apesar de a análise histopatológica da PAC em G2 e G3 ter mostrado alterações ainda em estágios iniciais, as alterações de expressão gênica encontraram-se bem estabelecidas, conforme visto também em outros trabalhos com etanol e vitamina E^{8,10,17,21}.

A suplementação com vitamina E, na presença de PAC, diminuiu a quantidade de transcritos apenas de fatores pró-inflamatórios, as proteínas COX-2 e α -SMA, e a citocina TNF- α , conferindo estímulo anti-inflamatório na injúria pancreática.

A COX-2 está diretamente relacionada com a gravidade da inflamação no tecido pancreático, e tem como

principal função catalisar a conversão dos produtos do ácido araquidônico para prostaglandina^{11,22-23}. Assim como neste trabalho, Schlosser *et al.*¹¹ também verificaram aumento na expressão de COX-2 em pacientes com PAC na ausência de suplementação com vitamina E. A vitamina E é capaz de inibir a atividade catalisadora da COX-2 na síntese de prostaglandinas E2, reduzindo a agregação plaquetária e o processo inflamatório²⁴⁻²⁵.

A α -SMA é uma proteína presente no citoesqueleto das células pancreáticas estreladas. Na presença de uma inflamação crônica, inicia-se a fibrogênese no tecido pancreático, por meio da ativação da proliferação das células pancreáticas estreladas. Dessa forma, a vitamina E diminuiu o estímulo para ativação dessas células fibrogênicas, por diminuir o número de transcritos para α -SMA, resultado que também foi observado por outros trabalhos com diferentes metodologias^{2,6,12,26-27}.

O TNF- α , que também teve sua transcrição diminuída pela suplementação com vitamina E, é uma das primeiras citocinas a ser produzida e liberada no início da resposta inflamatória, estimulando o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os sítios de infecção e aumentando a produção de quimiocinas²².

A suplementação com a vitamina E, na presença de PAC, aumentou a quantidade de transcritos apenas para a Pap, conferindo papel protetor contra os danos no tecido pancreático. A Pap é uma proteína que pode ser utilizada como marcador de pancreatite, sendo sintetizada em uma quantidade 200 vezes maior na pancreatite aguda²⁸. Embora os mecanismos ainda não estejam completamente elucidados, a Pap é um componente importante do mecanismo de defesa contra a injúria pancreática²⁹. Em estudo de Zhang *et al.*⁹, verificou-se que a inibição da expressão gênica de Pap exacerbou o dano pancreático avaliado por histologia, e aumentou a expressão de interleucinas em modelo de pancreatite aguda.

Sabe-se que o α -tocoferol apresenta um efeito direto na diminuição da expressão de genes envolvidos com respostas inflamatórias aguda e crônica, como COX-2, em patologias como diabetes tipo 2 e hepatite^{17,21,25,30}, mas até o presente estudo, não havia trabalhos na literatura avaliando o efeito da suplementação com vitamina E na expressão gênica de marcadores inflamatórios em PAC.

Conclusão

A suplementação com vitamina E apresentou efeitos anti-inflamatórios benéficos na expressão gênica pancreática de alguns biomarcadores do processo inflamatório em ratos com PAC. Na vigência de PAC, a suplementação da dieta com vitamina E promoveu uma diminuição do número de transcritos para genes biomarcadores da resposta inflamatória e aumento do gene protetor Pap, comprovando o benefício do α -tocoferol como potencial protetor ao tecido pancreático na PAC em ratos.

Referências

1. Condado DASA. Pancreatite aguda: estratificação de risco (dissertação de mestrado). Portugal: Universidade da Beira Interior, Covilhã; 2012.
2. Wilson JS, Apte MV. Role of alcohol metabolism in alcoholic pancreatitis. *Pancreas*. 2003;27(4):311-5.
3. Lerch MM, Albrecht E, Ruthenburger M. Pathophysiology of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas*. 2003;27(4):291-6.
4. Purohit V, Russo D, Salin M, Brown R. Mechanisms of alcoholic pancreatitis: introduction and summary of the symposium. *Pancreas*. 2003;27(4):281-5.
5. Wang L, Caspi CK, Lam M, Liu R, Wang R. *et al*. Lam Upper intestinal lipids trigger a gut-brain-liver axis to regulate glucose production. *Nature*. 2008;452:1012-6.
6. Lij, Guo M, Hu B, Liu R, Wang R, Tang C. Does chronic ethanol intake cause chronic pancreatitis?: evidence and mechanism. *Pancreas*. 2008;37(2):189-95.
7. Perkins PS, Rutherford RE, Pandol SJ. Effect of chronic ethanol feeding on digestive enzyme synthesis and mRNA content in rat pancreas. *Pancreas*. 1995;10(1):14-21.
8. Kubisch CH, Gukovsky I, Lugea A, Pandol SJ, Kuick R, Misek DE, *et al*. Long-term ethanol consumption alters pancreatic gene expression in rats: a possible connection to pancreatic injury. *Pancreas*. 2006;33(1):68-76.
9. Zhang H, Kandil E, Lin YY, Levi G, Zenilman ME. Targeted inhibition of gene expression of pancreatitis-associated protein exacerbates the severity of acute pancreatitis in rats. *Scand J Gastroenterol*. 2004;9(9):70-81.
10. Gukovsky I, Lugea A, Shahsahebi M. A rat model reproducing key pathological responses of alcoholic chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol*. 2008;294:G68-G79.
11. Schlosser W, Schlosser S, Ramadani M. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in chronic pancreatitis. *Pancreas*. 2002;25:26-30.
12. Haber PS, Keogh GW, Apte MV. Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *Am J Pathol*. 1999; 155:1087-95.
13. McDonough KH. Antioxidant nutrients and alcohol. *Toxicology*. 2003;189(1):89-97.

14. Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr Campinas*. 1999;12(2):123-30.
15. Steiner M. Influence of vitamin E on platelet function in humans. *J. Am. Coll. Nutr*. 1991;10:466-73.
16. Ozer NK, Boscoboinik D, Azzi A. New roles of low density lipoproteins and vitamin E in the pathogenesis of atherosclerosis. *Biochem. Mol. Biol. Int*. 1995;35:117-24.
17. Azzi A, Gysin R, Kempná P. Vitamin E mediates cell signaling and regulation of gene expression. *Ann M Y Acad Sci*. 2004; 1031:86-95.
18. Lieber CS, DeCarli LM. Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. *Alcohol Alcohol*. 1989;24(3):197-211.
19. Siqueira-Silva C. Gene expression analysis in chronic alcoholism experimental model: probable adaptive response to alcohol hepatotoxicity (Thesis). Ribeirão Preto-SP: Internal Medicine Post Graduation in Biomedical Research of University São Paulo; 2010.
20. National Academies Press. Nutrient requirements laboratory animals. 4th. Washington DC: 1995.
21. Zingg JM. Modulation of signal transduction by vitamin E. *Mol. Aspects Med*. 2007;28:481-506.
22. Abbas AK. Cellular and molecular immunology. 5^a ed London: Saunders; 2003.
23. Koliopoulos A, Friess H, Kleeff J. Cyclooxygenase 2 expression in chronic pancreatitis: correlation with stage of the disease and diabetes mellitus. *Digestion*. 2001;64:240-7.
24. Zingg JM. Vitamin E: An overview of major research direction. *Mol. Aspects Med*. 2007a;28:400-22.
25. Zingg JM. Molecular and cellular activities of vitamin E analogues. *Mini-Rev Med. Chem*. 2007;7:543-58.
26. Schneider E, Schmid-Kotsas A, Zhao J. Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;281: C532-C43.
27. Apte MV, Phillips PA, Fahmy RG. Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells. *Gastroenterology*. 2000;118(4):780-94.
28. Keim V, Willemer S, Iovanna JL, Adler G, Dagorn JC. Rat pancreatitis-associated protein is expressed in relation to severity of experimental pancreatitis. *Pancreas*. 1994;9(5):606-12.
29. Orelle B, Keim V, Masciotra L, Dagorn JC, Iovanna JL. Human pancreatitis-associated protein. Messenger RNA cloning and expression in pancreatic diseases. *J Clin Invest*. 1992;90:2284-91.
30. Brigelius-Flohé R. Vitamin E: The shrew waiting to be tamed. *Free Radic Biol Med*. 2009;46:543-54.

Endereço para correspondência:

Tatiana Elias Colombo
Av. Juscelino K. de Oliveira, s/nº
Jardim Tarraf II
São José do Rio Preto-SP, CEP 15092-415

E-mail: tatyec@hotmail.com

Recebido em 15 de janeiro de 2014
Aceito em 16 de abril de 2014