



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



**MARIA TERESITA DEL NIÑO JESUS FERNANDEZ BENDICHO**

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DAS  
CITOCINAS TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, IL-10 E TNF- $\alpha$  NAS  
PANCREATITES AGUDAS E CRÔNICAS.**

Salvador  
2008

**MARIA TERESITA DEL NIÑO JESUS FERNANDEZ BENDICHO**

**ESTUDO DO POLIMORFISMO DAS CITOCINAS TGF- $\beta$ ,  
IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, IL-10 E TNF- $\alpha$  NAS PANCREATITES  
AGUDAS E CRÔNICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Imunologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Carneiro Lemaire.  
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Guilherme Lyra.

Salvador  
2008

## RESUMO

As pancreatites são as principais patologias envolvendo o pâncreas exógeno. A pancreatite crônica é um distúrbio inflamatório, cujas conseqüências referem-se à destruição anatômica e funcional progressiva e permanente do pâncreas. A pancreatite aguda é, na maioria dos casos, uma doença inflamatória, autolimitada. Caracteriza-se por intenso processo inflamatório, muitas vezes com necrose e desencadeamento de síndrome de resposta inflamatória sistêmica. Estudos de associação de polimorfismos em genes de citocinas e doenças têm sido uma área de grande interesse pela contribuição no conhecimento dos mecanismos que as condicionam. No presente trabalho foram analisados os polimorfismo dos genes IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF $\beta$ 1 e IFN- $\gamma$  em indivíduos com Pancreatite crônica atendidos no ambulatório de Gastroenterologia do C- HUPES e em indivíduos com pancreatite aguda atendidos no C-HUPES, HCRS, HSR e Hospital Aliança. As freqüências dos polimorfismos nestes grupo foram comparadas às freqüências observadas em uma amostra de doadores voluntários de sangue de Salvador e participantes de um grupo da "Terceira Idade". Foram comparadas as distribuições dos seguintes polimorfismos *TNF- $\alpha$*  (-308G/A), *TGF- $\beta$ 1* (codon10C/T, códon 25C/G), *IL-10* (-1082 A/G; -819T/C; -592A/C), *IL-6* (-174G/C) e *IFN- $\gamma$* (+874T/A). Observou-se diferença estatisticamente significativa nas freqüências de polimorfismos entre o grupo de pacientes com pancreatite crônica e o de indivíduos sadios no polimorfismo do gene do TGF- $\beta$ 1, e do IL-6 do grupo de pacientes com pancreatite crônica com os pacientes com pancreatite aguda e com o grupo controle. Não foram encontradas diferenças significantes nas freqüências alélicas e genotípicas nos genes que codificam TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 entre os grupos caso e controle.

Palavras chave: Polimorfismo genético, genes de citocinas, Pancreatite crônica, Pancreatite aguda.

## RESUMEN

Las pancreatitis son las principales enfermedades de el páncreas exógeno. La pancreatitis es una enfermedad inflamatoria crónica, cuyas consecuencias se refieren a la destrucción anatómica y funcional progresiva y permanente del páncreas. La pancreatitis aguda es, en la mayoría de los casos, una enfermedad inflamatoria, autolimitada. Se caracteriza por un intenso proceso inflamatorio, a menudo con la necrosis y el desarrollo de la síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica. Estudios de asociación de polimorfismos en los genes de citoquinas, y las enfermedades han sido un área de gran interés para la contribución que el conocimiento de los mecanismos que influyen.

En el presente estudio se analizó el polimorfismo de genes de IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 e IFN- $\gamma$  en los individuos con pancreatitis crónica visto en la clínica de gastroenterología de la C-HUPES y en pacientes con pancreatitis aguda visto en el C-HUPES, HCRS, HSR y Hospital Aliança. Las frecuencias de estos polimorfismos se han comparado a las tasas de una muestra de donantes voluntarios de sangre em Salvador y los participantes de un grupo de "Tercera Edad".

Se compararon las distribuciones de los polimorfismos de TNF- $\alpha$  (-308G/A), TGF- $\beta$ 1 (codon10C/T, códon 25C/G), IL-10 (-1082 A/G; -819T/C; -592A/C), IL-6 (-174G/C) e IFN- $\gamma$  (+874T/A). Hubo una diferencia estadísticamente significativa en las frecuencias de polimorfismos entre los pacientes con pancreatitis crónica y de individuos sanos en el polimorfismo del gen de TGF- $\beta$ 1, y para IL-6 en el grupo de pacientes con pancreatitis crónica, pacientes con pancreatitis aguda y el grupo de control. No hubo diferencias significativas en frecuencias de los alelos y del genotipo en los genes que codifican TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 entre los grupos de casos y de control.

Palabras clave: polimorfismo genético, genes de citoquinas, pancreatitis crónica, pancreatitis aguda.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Figura 1 -	SNPs e aminoácidos nas posições +869 e +915 do gene <i>TGFB1</i>	23
Figura 2 -	Constituição de um ácino pancreático	32
Figura 3 -	Corte histológico de tecido pancreático normal e com fibrose	40
Figura 4 –	Dosagem de TGF- $\beta$ 1 em sobrenadante de cultura de sangue sem estímulo (puro), com Lipopolisacarideo (LPS) e com pokeweed (PWM) em pacientes com PA e em pacientes com PC.	72
Figura 5 -	Dosagem de TGF- $\beta$ 1 em sobrenadante de cultura de sangue sem estímulo (puro), com Lipopolisacarideo (LPS) e com pokeweed (PWM) em indivíduos com fenótipo previsto de intermediário e alto produtores de TGF- $\beta$ 1	73

### Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Dados demográficos dos pacientes e controles participantes do estudo.	57
Tabela 2 -	Freqüências alélicas e genótípicas para o polimorfismo do gene de TGF- $\beta$ 1 (códon 10T/C).	59
Tabela 3 -	Freqüências alélicas e genótípicas para o polimorfismo do gene de TGF- $\beta$ 1 (códon 25G/C).	61
Tabela 4 -	Freqüências genótípicas e fenotipos previstos para o polimorfismo do gene de TGF- $\beta$ 1 (códon 10T/C; códon 25G/C).	63
Tabela 5 -	Freqüências para o polimorfismo do gene de TGF- $\beta$ 1 (códon 10T/C) em diferentes grupos populacionais e os doadores de sangue do grupo controles.	65
Tabela 6 -	Freqüências para o polimorfismo do gene de TGF- $\beta$ 1 (códon 25G/C) em diferentes grupos populacionais e os doadores de sangue do grupo controles.	67
Tabela 7 -	Freqüências alélicas, genótípicas e fenotipos previstos para o polimorfismo -174 G/C do gene de IL-6.	69
Tabela 8 -	Freqüências alélicas, genótípicas e fenotipos previstos para o polimorfismo -308 G/A do gene de TNF- $\alpha$ .	71
Tabela 9 -	Freqüências alélicas, genótípicas e fenotipos previstos para o polimorfismo +874 T/A do gene de IFN- $\gamma$ .	72
Tabela 10 -	Freqüências alélicas, genótípicas e fenotipos previstos para os polimorfismos -1082G/A, -819C/T e -592C/A do gene de IL-10.	74

Tabela 11 –	Dosagem de TGF- $\beta$ 1 em sobrenadante de cultura de sangue sem estímulo (puro), com Lipopolisacarideo (LPS) e com pokeweed (PWM) em pacientes com PA e em pacientes com PC; fenótipo previstos de produção de TGF- $\beta$ 1 .	75
Tabela 12 –	Estatística descritiva da dosagem de TGF- $\beta$ 1 em sobrenadante de cultura de sangue sem estímulo (puro), com Lipopolisacarideo (LPS) e com pokeweed (PWM) em pacientes com PA e em pacientes com PC.	76
Tabela 13 –	Estatística descritiva da dosagem de TGF- $\beta$ 1 em sobrenadante de cultura de sangue sem estímulo (puro), com Lipopolisacarideo (LPS) e com pokeweed (PWM) em pacientes com fenótipo previsto de intermediário (Interm) e alto produtor de TGF- $\beta$ 1 .	78
Tabela 14 –	Dosagem de IL-17 em sobrenadante de cultura de sangue sem estímulo (puro), com Lipopolisacarideo (LPS) e com pokeweed (PWM) em pacientes com PA e PC.	79

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CEP- Células Estelares do Pâncreas

C-HUPES – Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos

CO<sub>2</sub> – gás carbônico

dL - decilitro

DNA- Ácido Desoxirribonucléico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – ensaio imunossorvente ligado a enzima

g - grama

HA - Hospital Aliança

HCRS - Hospital Central Roberto Santos

HSR - Hospital São Rafael

IFN- $\gamma$ - Interferon  $\gamma$

IL-10- Interleucina 10

IL-17- Interleucina 17

IL-1 $\beta$  - Interleucina 1B

IL-6- Interleucina 6

KCl – cloreto de potássio

LPS - Lipopolissacarídeo

mA - miliampere

MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O – cloreto de magnésio hexahidratado

mL - mililitro

mM – milimolar

MMP - metaloproteinases da matriz

MODS - Síndrome da disfunção múltipla de órgãos

NO - Óxido nítrico

PA- Pancreatite Aguda

PAF- (Platelet activating factor) Fator ativador de plaquetas

PAP – Proteína associada a Pancreatite

PC- Pancreatite Crônica

PCR- Reação de polimerização em cadeia

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas



PHA - Fitohemaglutinina

PWM - Pokweed (mitógeno da *Phytolacca americana*)

ROS - (reactive oxygen species) espécies de oxigênio reativo

SIRS – Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

TGF- $\beta$  - Fator de Transformação do crescimento- $\beta$

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral - $\alpha$

U – unidades

UNEB - Universidade Estadual da Bahia

V - volts

$\mu\text{g}$  – microgramas

$\mu\text{L}$  - microlitro

## Sumário

1 . Introdução.....	16
2. Revisão de literatura.....	19
2.1. Polimorfismo de citocinas.....	19
2.1.1. Fator de Transformação do Crescimento- $\beta$ 1 .....	20
2.1.2. Interleucina 6 .....	23
2.1.3. Interleucina 10 .....	24
2.1.4. Fator de necrose tumoral- $\alpha$ .....	25
2.1.5. Interferon gama .....	27
2.2. Pancreatite Aguda.....	29
2.2.1. Epidemiologia e fatores etiológicos.....	29
2.2.2. Fisiopatologia .....	30
2.2.3. Citocinas nas Pancreatites Agudas.....	35
2.2.3.1. Fator de necrose tumoral- $\alpha$ .....	36
2.2.3.2. Interleucina 1.....	37
2.2.3.3. Interleucina 6.....	37
2.2.3.4. Interleucina 10.....	37
2.3. Pancreatite Crônica.....	38
2.3.1. Epidemiologia e fatores etiológicos.....	38
2.3.2. Fisiopatologia .....	39
2.3.3. Citocinas nas Pancreatites Crônicas.....	41
2.3.3.1.Fator de Transformação do Crescimento- $\beta$ 1 .....	42
2.3.3.2. Interleucina 6 .....	42
2.3.3.3. Interleucina 10.....	42
2.3.3.4. Interleucina 17.....	42
2.4. Estudos de associação entre os polimorfismos genéticos de citocinas e pancreatites.....	42

3. Objetivos.....	44
4. Delineamento do estudo.....	45
5. Material e método.....	47
5.1. Seleção de pacientes .....	48
5.1.1. Grupo de pancreatite aguda.....	48
5.1.2. Grupo de pancreatite crônica.....	48
5.2. Seleção do grupo controle .....	49
5.2.1. Controles pareados para pancreatite aguda .....	49
5.2.2. Controles para pancreatite crônica .....	49
5.3. Termo de consentimento livre e pré- esclarecido .....	49
5.4. Coleta de sangue .....	49
5.5. Extração de DNA genômico .....	49
5.6. Genotipagem de citocinas .....	50
5.6.1. TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 E TNF- $\alpha$ .....	50
5.7. produção de citocinas <i>in vitro</i> .....	50
5.7.1. Cultura de sangue total .....	50
5.7.2. Dosagem de IL-6, IL-17 e TGF- $\beta$ .....	52
5.8. Cálculo amostral .....	53
5.9. Análise estatística .....	54
6. Resultados .....	54
6.1. Polimorfismos de citocinas .....	58
6.1.1 Polimorfismos (códon 10T/C; códon 25G/C) do gene de TGF- $\beta$ 1.58	
6.1.1.1. Códon 10 (T/C) .....	58
6.1.1.2. CÓDON 25 (G/C) .....	60
6.1.1.3. Distribuição das freqüências fenotípicas.....	62
6.1.2. Polimorfismo -174G/C do gene de IL-6 .....	64
6.1.3. Polimorfismo no gene TNF- $\alpha$ na posição -308 .....	66
6.1.4. Polimorfismo +874 T/A do gene do IFN- $\gamma$ .....	68
6.1.5. Polimorfismos (-1082G/A; -819C/T; -592C/A) do gene de IL-10	70
6.1.6 Equilíbrio de Hardy-Weinberg .....	70
6.2 Produção de citocinas <i>in vitro</i> .....	72
6.2.1- Fator de transformação do crescimento- $\beta$ - (TGF- $\beta$ 1) .....	75
6.2.2 Interleucina -6 (IL-6) .....	75

6.2.3 Interleucina -17 (IL-17) .....	75
7.Discussão.....	77
8. Conclusões.....	86
Referências	

Apêndice - Pâncreas

Anexos

Anexo A – Termo de consentimento – Pacientes com Pancreatite Aguda

Anexo B – Termo de consentimento - Pacientes com Pancreatite Crônica

Produto da tese

Polymorphism of Cytokine Genes (TGF- $\beta$ 1, IFN-g, IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$ ) in Patients With Chronic Pancreatitis.

Polymorphism of Cytokine Genes (TGF- $\beta$ 1, IFN-g, IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$ ) in Patients With Chronic and Acute Pancreatitis.

A Pancreatite aguda na visão do imunologista.

## 1. INTRODUÇÃO

As pancreatites são as principais patologias envolvendo o pâncreas exógeno, e são classificadas em crônicas ou agudas.

A Pancreatite Crônica (PC) é um distúrbio inflamatório, cujas conseqüências referem-se à destruição anatômica e funcional progressiva e permanente do pâncreas. Tais condições comprometem as funções endócrinas e exócrinas do pâncreas. No curso da doença, verifica-se a ocorrência de metaplasia, caracterizada pela substituição progressiva do tecido normal por tecido fibrótico em resposta ao processo inflamatório. Isso acarreta a diminuição do número de ácinos pancreáticos e das Ilhotas de Langerhans responsáveis pela produção de enzimas e hormônios, respectivamente (ETEMAD & WHITCOMB, 2001; PHILLIPS *et al.*, 2003). Clinicamente, este processo está associado com a dor abdominal crônica na maioria dos pacientes, perda de peso, esteatorréia e diabetes. Estes pacientes necessitam de inúmeras visitas hospitalares, realizam diversas intervenções cirúrgicas e não cirúrgicas e uso constante de medicações. Esse diagnóstico revela um risco aumentado de mortalidade precoce e de evolução para desenvolver de carcinoma pancreático (BEHRMAN & FOWLER, 2007).

A Pancreatite Aguda (PA) é, na maioria dos casos, uma doença inflamatória, autolimitada. Caracteriza-se por intenso processo inflamatório, muitas vezes com necrose e desencadeamento de síndrome de resposta inflamatória sistêmica (CARNEIRO *et al.*, 2006). Cerca de dois terços dos pacientes apresentam evolução benigna e disfunções orgânicas mínimas ou ausentes e se recuperam em poucos dias. Os outros 20% a 30% evoluem para forma grave com hipotensão arterial, choque, disfunção renal, pulmonar, íleo prolongado e sepse. Os pacientes com formas leves de PA muitas vezes não comparecem a serviços de saúde, mas os casos graves requerem internamento e cuidados adicionais (TRIVIÑO *et al.*, 2002).

A incidência de PA é de 5 a 50 casos por 100.000 habitantes por ano, com grandes variações geográficas. A mortalidade global por PA varia de 10%

a 15% dos casos, sendo que cerca de 50% dos óbitos ocorrem na fase precoce da doença, isto é, nos primeiros 14 dias da admissão (FEVEREIRO *et al.*, 2000, SANTOS *et al.*, 2003).

Numa casuística apresentada por Cunha e colaboradores na VI Semana Brasileira do Aparelho Digestivo (2004), de 184 pacientes atendidos no Hospital Português, na cidade de Salvador, nove pacientes (5%) faleceram. A mortalidade foi significativamente associada à gravidade do episódio de PA, à idade do paciente e à presença de co-morbidade.

Apesar do mecanismo de desenvolvimento destas patologias não estar claro, a participação de componentes imunológicos na inflamação e/ou na formação de fibrose já está estabelecido. Entre estes componentes incluem-se as citocinas, que são importantes reguladores da resposta imune, modulando mecanismos fisiopatológicos que determinam a evolução de doenças (PAPACHRISTOU *et al.*, 2007).

A modulação da resposta imune, tanto celular como humoral, é controlada primariamente pela secreção de citocinas por vários tipos celulares. A capacidade máxima de produção *in vitro* de diferentes citocinas em resposta à estimulação por mitógenos foi mostrada como sendo variável entre diferentes indivíduos. Essas diferenças podem ser atribuídas a alguns mecanismos moleculares, envolvidos nos processos de transcrição, tradução e vias de secreção. Foram descritas mutações dentro de regiões codificantes e variações de seqüências de resíduos de nucleotídeos dentro de regiões regulatórias (seqüências promotoras, repressoras ou ativadoras da transcrição) de genes de citocinas. Estas variações representam os polimorfismos de genes de citocinas que podem estar envolvidos nas diferentes expressões e secreção de citocinas tanto *in vitro* como *in vivo*.

A proposta deste trabalho, realizado em colaboração com o Serviço de Gastroenterologia do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos e o Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde, foi de ampliar o conhecimento dos processos imunológicos envolvidos nas pancreatites. Os dados dessa pesquisa podem expandir o entendimento destas patologias e, assim, nortear a continuidade de estudos com essa finalidade.

Buscando identificar potenciais marcadores genéticos de suscetibilidade ao desenvolvimento de pancreatite crônica em pacientes já

diagnosticados e atendidos num ambulatório da cidade de Salvador-BA, foram analisados polimorfismos funcionais em cinco diferentes genes de citocinas (fator de transformação do crescimento  $\beta 1$ – TGF- $\beta 1$  [códon 10 T/C, códon 25 G/C], interferon- $\gamma$  - IFN- $\gamma$  [+874T/A], interleucina 6 – IL-6 [-174 G/C], interleucina -10 – IL-10 [-1082 A/G; -819T/C, -592 A/C] e fator de necrose tumoral- $\alpha$  - TNF- $\alpha$  [-308 G/A].

Nesse estudo, foi evidenciada a associação entre predisposição genética à alta produção de TGF- $\beta 1$  e risco de desenvolvimento de pancreatite crônica em mestiços brasileiros. A continuação do trabalho objetivou a confirmação desses dados e adição de novas informações.

A divergência entre especialistas da área de gastroenterologia quanto às pancreatites serem patologias distintas, ou a pancreatite crônica ser uma conseqüência de eventos da pancreatite aguda, mesmo em forma subclínica, direcionou ao questionamento se há diferenças nos pacientes com PC e com PA quanto a esses polimorfismos de genes de citocinas. Nenhum estudo com essa abordagem havia sido até então identificado. Isso nos levou a iniciar a avaliação de pacientes com pancreatite aguda para as mesmas citocinas abordadas para os pacientes com pancreatite crônica.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 POLIMORFISMO DE CITOCINAS

Citocinas são proteínas ou glicoproteínas solúveis que modulam diversas atividades celulares ao se ligarem aos respectivos receptores nas células alvo (HOLLOWAY *et al.*, 2001; KEEN, 2002; HOPKINS, 2003). As citocinas e seus receptores são freqüentemente codificados por genes com alto grau de polimorfismo (HOPKINS, 2003). Por definição, polimorfismo genético é a coexistência de formas alélicas múltiplas para um mesmo locus gênico, como componentes estáveis, presentes em pelo menos 1% da população. Estudos de identificação de polimorfismo em genes de citocinas e seus receptores identificaram que estes genes são muito polimórficos, mas que as seqüências nos exons são conservadas (BIDWELL *et al.*, 1999). A maioria dos polimorfismos identificados, até o momento, está localizada nas regiões não transcritas dos genes (KEEN, 2002). Os polimorfismos nestas regiões do gene podem afetar a expressão, inibindo ou estimulando a transcrição, dependendo dos elementos regulatórios e do nível de regulação envolvido (KEEN, 2002; HOPKINS, 2003).

Variações na seqüência de resíduos de nucleotídeos dos genes de citocinas ou de seus receptores têm sido descritas em indivíduos saudáveis, sendo tais polimorfismos associados a mudanças da expressão da proteína e a diferenças interindividuais no perfil de citocinas secretadas (BIDWELL *et al.*, 1999). Essa diferença na produção de citocinas foi relacionada aos diferentes genótipos, e os indivíduos de acordo com esses genótipos são identificados como tendo o fenótipo previsto de alto, intermediário ou baixo produtor da referida citocina (WARLÉ *et al.*, 2003).

Os estudos realizados *in vitro* permitem verificar os níveis de RNA de citocinas ou dos seus receptores. Os estudos de associação dos polimorfismos a doenças têm como objetivo identificar marcadores de proteção ou susceptibilidade para uma dada condição mórbida. Estes são estudos do tipo caso-controle, que comparam a freqüência do polimorfismo de uma citocina



entre um grupo de indivíduos que apresentam a doença e outro grupo sem a doença. Outra abordagem realizada é a comparação direta do genótipo da citocina dos indivíduos com a respectiva doença e o aspecto clínico da mesma. A realização de estudos de família é utilizada para obter informações da segregação da doença (BIDWELL *et al.*, 1999).

Resultados por vezes discordantes são encontrados nos diversos estudos que têm como alvo citocinas. Algumas hipóteses são apontadas para explicar essas diferenças como: (1) estudos que utilizam cultura de células são influenciados por vários fatores, como a linhagem de células utilizada e o tratamento dado a elas; (2) tamanho da amostra estudada; (3) as doenças, freqüentemente, são multifatoriais e podem estar associadas a mais de uma citocina (BIDWELL *et al.*, 1999; KEEN 2002).

Em revisões sistemáticas publicadas por Bidwell e colaboradores (1999, 2001, 2002, 2005), foram enumerados os polimorfismos identificados em genes de citocinas e/ou de seus receptores, assim como estudos de expressão das citocinas *in vitro*, e estudos de associação desses polimorfismos e diversas doenças. Os autores citam 234 polimorfismos em genes de citocinas já descritos, e 1.544 artigos abordando estudos de associação com doenças, mostrando o interesse científico nesta área.

De acordo com Ollier (2004), a análise do polimorfismo dos genes das citocinas e como estes se relacionam à susceptibilidade e gravidade da doença podem contribuir no entendimento da etiopatogênese, na estimativa do risco da doença, apontar novos alvos terapêuticos e uma melhor observação da heterogeneidade clínica. Para conseguir esses resultados, destaca o autor, os estudos precisam ser conduzidos de forma criteriosa e precisam de um entendimento adequado da complexidade do ambiente de citocinas.

### 2.1. 1. FATOR DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO- $\beta$ 1 - (TGF- $\beta$ 1)

O TGF- $\beta$  possui 5 isoformas conhecidas, as quais se denominam TGF- $\beta$ 1 a TGF- $\beta$ 5. Os três primeiros são encontrados no homem, e em quase todas as espécies animais (LETTERIO & ROBERTS, 1997).

As formas ativas dos TGF- $\beta$ 1, 2 e 3 são dímeros muito similares, e seus genes estão localizados nos cromossomos 19q13, 1q41 e 14q24, respectivamente. São codificados como moléculas precursoras as quais são processadas (proteólise) para a forma biologicamente ativa. A ativação dessas formas *in vivo* é altamente regulada, em processo ainda não completamente entendido, no qual estão envolvidos mecanismos proteolíticos, de oxi-redução, radicais livres incluindo óxido nítrico e ligação a moléculas tais como trombospondina (LETTERIO & ROBERTS, 1997).

O TGF- $\beta$ 1 é expresso constitutivamente por muitas células e tecidos, como por exemplo plaquetas, linfócitos B e T, fibroblastos, osteoblastos e osteoclastos, astrócitos e células da micróglia. Sua produção pode ser aumentada por estímulo e sua expressão pode ser regulada em nível transcricional e pós-transcricional (GOVINDEN & BHOOLA, 2003).

O TGF- $\beta$ 1 está envolvido em uma grande variedade de processos fisiológicos e patológicos, incluindo proliferação e diferenciação celular, desenvolvimento embrionário, morfogênese tecidual, angiogênese, fibrose, cicatrização de ferimentos e respostas imunes (SANVITO *et al.* 1995; MORA-GARCIA & SAKAMOTO, 1999; SYVANEN, 2000; MASSAGUÉ, 2005).

O TGF- $\beta$ 1 aumenta a expressão de moléculas de adesão e modula a síntese e deposição de componentes da matriz extracelular, pelo aumento da expressão de genes que codificam a fibronectina, vários colágenos e outras moléculas da matriz extracelular. É considerado um agente fibrosante potente, promovendo a rápida deposição de colágeno na matriz extracelular em processo cujos mecanismos ainda necessitam ser estabelecidos (BROWN *et al.*, 2002). A alteração na produção do TGF- $\beta$ 1 pode resultar em doenças fibrosantes geralmente por um depósito excessivo de proteínas da matriz extracelular e um aumento na síntese de moléculas de adesão intercelular (AWAD *et al.*, 1998; EL-GAMEL *et al.*, 1999; LI *et al.*, 1999; BAAN *et al.*, 2000; HOLWEG *et al.*, 2001; R. GOVINDENA & BHOOLAB, 2003).

O TGF- $\beta$ 1 é um importante regulador da inflamação, atuando como pró-inflamatório em baixas concentrações, e antiinflamatório em altas concentrações. Ambas as propriedades, anti e pró-inflamatórias, dependem do ambiente e da concentração de outras citocinas. Na condição de citocina pró-

inflamatória promove a quimiotaxia dos leucócitos e fibroblastos até os locais de lesão. Uma parte dessa atividade depende do aumento da produção de moléculas de adesão intercelular e, desse modo, facilita a diapedese. O TGF- $\beta$ 1 atua como antiinflamatório e reparador de lesões estimulando os macrófagos e os fibroblastos a aumentarem sua capacidade de síntese de proteínas da matriz extracelular. Simultaneamente, inibe as proteases e estimula a síntese de outros inibidores de proteases que impedem a digestão enzimática das proteínas da matriz extracelular. O TGF- $\beta$ 1, em altas concentrações, suprime a produção de TNF- $\alpha$  e de óxido nítrico pelos macrófagos. Inibe também a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  pelas células NK e tem ação antagônica ao IFN- $\gamma$ . Regula positivamente a expressão dos antígenos do HLA de classe II do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC). Todas estas ações podem modular as reações inflamatórias e facilitam a cicatrização das lesões tissulares (VODOVOTZ, 1997; OMER *et al.*, 2000; BROWN *et al.*, 2002).

Diversos polimorfismos já foram identificados no gene do TGF- $\beta$ 1, sendo três localizados na região à montante do primeiro nucleotídeo transcrito, nas posições -988C/A, -869G/A e -509C/T; um na região não traduzida, na posição +72(+C), três na região codificadora do gene que codifica uma seqüência de resíduos de aminoácidos na forma ativa: Leu10/Pro (códon 10), Arg25/Pro (códon 25) e Thr263/Ile (CAMBIEN *et al.*, 1996; AWAD *et al.*, 1998).

As mutações no códon 10 (Leu/Pro) e no códon 25 (Arg/Pro) foram associadas com o fenótipo de alto produtor de TGF- $\beta$ 1, (HUTCHINSON *et al.*, 1998; GRAINGER *et al.*, 1999).

<i>TGFB1</i>		
Posição	+869	+915
Códon	10	25
SNP	T $\Rightarrow$ C	G $\Rightarrow$ C
Aa	Leucina $\Rightarrow$ Prolina	Arginina $\Rightarrow$ Prolina

FIGURA1: SNPS E AMINOÁCIDOS NAS POSIÇÕES +869 E +915 DO GENE *TGFB1*

Fonte: PERREY *et al.*, 1998

Awad e colaboradores (1988) correlacionam o fenótipo de alto produtor de TGF- $\beta$ 1, com a presença de determinado alelo no códon 25. Quanto à correlação deste fenótipo com a presença de um alelo no códon 10 há divergências em alguns estudos (HUTCHINSON, 1998; SUTHANTHIRAN *et al.*, 2000). Apesar dessas diferenças é aceito que os polimorfismos no códon 10 e 25, determinam o fenótipo de alto ou baixo produtor dessa citocina (HUTCHINSON *et al.*, 1998; GRAINGER *et al.*, 1999; STANCZUK *et al.*, 2002).

### 2.1.2 INTERLEUCINA 6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica originalmente identificada como fator de diferenciação de células B. É multifuncional e regula a resposta imune, a hematopoese, a resposta de fase aguda e a inflamação. É produzida por diversas células incluindo fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B, células endoteliais, célula gliais e queratinócitos, em resposta a uma variedade de estímulos externos. Possui estrutura helicoidal similar a muitas outras citocinas, e seu gene localiza-se no cromossomo 1q21 (ISHIHARA & HIRANO, 2002; MOCELLIN *et al.*, 2003).

No início da inflamação a IL-6 é mediadora da resposta de fase aguda, e sua concentração sérica pode estar alterada em muitas doenças, sendo na sua maioria doenças autoimunes tais como: artrite reumatóide, doença proliferativa inflamatória crônica, lupus eritematoso sistêmico, diabetes tipo I dependente de insulina. Tem sido proposto que, em alguns casos, como nas doenças infecciosas crônicas, sua produção poderia modular a expressão de alguns sintomas adversos. Excesso da IL-6 *in vivo* promove a ativação de células B policlonais, plasmocitose e neoplasia de células B. Nesta neoplasia, a síntese de IL-6 pelas células malignas tem sido relacionada com a progressão e extensão de câncer (ISHIHARA & HIRANO, 2002; PANTSULAIA *et al.*, 2002). Uma ação anti-inflamatória da IL-6 tem sido apontado em diversos estudos, a qual ocorreria pela inibição da IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (TILG *et al.*, 1994; 1997; CUZZOCREA *et al.*, 2002).

A caracterização da região promotora do gene de IL-6 revelou uma região altamente conservada de 300 pb à montante do sítio de iniciação transcricional contendo a maioria, se não todos os elementos necessários para a sua indução por estímulos comumente associados com a inflamação aguda ou estados proliferativos (BERGHE *et al.*, 2000).

Foram identificados, até o momento, quatro polimorfismos na região promotora do gene da IL-6, -597G/A, -572G/C, -373A (9n)T(n), -174G/C (ISHIHARA & HIRANO, 2002). Um polimorfismo na região flanqueadora 5' do gene da IL-6 na posição -174G/C parece afetar a transcrição da IL-6 (FISHMAN *et al.*, 1987). Os indivíduos com genótipo homozigoto para o alelo G e heterozigoto GC, mostraram maiores níveis de IL-6 no plasma, alta atividade transcricional e maior indução de resposta do que indivíduos homozigotos para o alelo C (OLIVIERE *et al.*, 2002).

Fishman e colaboradores (1987) observaram uma baixa frequência do genótipo -174C/C em pacientes com artrite crônica juvenil em relação à frequência observada em indivíduos saudáveis.

### 2.1.3 INTERLEUCINA 10 (IL-10)

A IL-10 representa uma das mais importantes citocinas imunoregulatórias. É produzida por macrófagos, células B, células T e uma variedade de outras células como mastócitos, queratinócitos e algumas linhagens de células tumorais. O efeito da IL-10 na resposta imune é principalmente, inibição dos monócitos e macrófagos e, indiretamente, supressão de IL-1 e TNF- $\alpha$  (MOCELLIN *et al.*, 2003). Possui capacidade para inibir a síntese e atividade de muitas citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 e TNF- $\alpha$  (GUNNET *et al.*, 2000; ZOU *et al.*, 2001), e tem sido considerada como uma possibilidade terapêutica em doenças inflamatórias mediadas por células Th1 (CONTI *et al.*, 2003; HADDAD *et al.*, 2003; MEGE *et al.*, 2006).

A IL-10 diminui a expressão dos antígenos HLA da Classe II de monócitos, macrófagos e outras células que atuam como células apresentadoras de antígenos (ESKDALE *et al.*, 1997; HADDAD *et al.*, 2003).

A IL-10 é um homodímero de 36 kDa; seu gene está localizado no cromossomo 1 entre 1q31 e 1q32. Aproximadamente três quartos da variabilidade interindividual da IL-10 estão associados com variações genéticas (LAZARUS *et al.*, 2002).

Foi observado que camundongos IL-10 *knock out* apresentam aumento da produção de citocinas inflamatórias e neles é freqüente o aparecimento de doenças inflamatórias (CONTI *et al.*, 2003). Da mesma forma, em trabalhos experimentais utilizando ratos manipulados geneticamente para não produzirem IL-10, as células fagocitárias escapam de seu controle habitual e infiltra-se maciçamente no intestino, que está em contato com as endotoxinas das enterobactérias comensais. Histologicamente, esta doença dos ratos simula algumas doenças inflamatórias do tubo digestivo dos humanos. Os ratos que não produzem IL-10 também não podem controlar a produção de citocinas pelos macrófagos estimulados com endotoxinas. Por essa razão, têm níveis elevados de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8 no soro (KOTENKO, 2002).

O gene da IL-10 é altamente polimórfico e certos haplótipos resultam em diferentes níveis de expressão dessa citocina (MÄURER *et al.*, 2000). Foram descritos diversos polimorfismos, sendo que os que ocorrem nas posições -1082G/A, -819C/T e 592C/A estão relacionados com maior ou menor produção da IL-10 (TURNER *et al.*, 1997). Estudos *in vivo* têm associado esses polimorfismos ao risco de desenvolvimento de diversas doenças incluindo asma (LIM *et al.*, 1998), Lupus Eritematoso Sistêmico (LAZARUS *et al.*, 1997; MOK *et al.*, 1998) e artrite reumatóide (HAJEER *et al.*, 1998; CANTAGREL *et al.*, 1999).

#### 2.1.4 FATOR DE NECROSE TUMORAL- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

A TNF- $\alpha$  é uma citocina pleiotrópica produzida principalmente por macrófagos, embora muitas outras células a produzam sob estímulo apropriado. Como estímulo podem ser referidos produtos bacterianos, especialmente lipopolissacarídeos, luz ultravioleta, infecções virais, células B alogênicas, protozoários e outros microrganismos. Incluem-se entre elas

células que quando estimuladas produzem TNF- $\alpha$ , os linfócitos T (Th1 e Tc) e B, células NK, células do endotélio vascular, queratinócitos, células do músculo liso, mastócitos, neutrófilos, astrócitos, e células gliais (WILSON *et al.*, 1997).

A produção de TNF pode ser aumentada por estímulo de citocinas e outros mediadores endógenos, incluindo o próprio TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-2, TGF- $\beta$ , substância P e fator ativador de plaquetas. Outras substâncias endógenas podem inibir sua produção como prostaglandinas, corticosteróides, IL-4, IL-6 e TGF- $\alpha$ .

O TNF- $\alpha$  é sintetizado como uma proteína de membrana de 26 KDa, biologicamente ativa, a qual é clivada para produzir uma forma solúvel de 17KDa. A forma solúvel desenvolve ações na inflamação e possui também atividades imunomodulatórias.

O gene do TNF- $\alpha$  está localizado na região de Classe III do MHC, altamente polimórfica, no cromossomo 6p21.3 (WILSON *et al.*, 1997; HAJEER & HUTCHINSON, 2000). Diversos elementos na região 5' do gene do TNF- $\alpha$  foram identificados como importantes na regulação da sua expressão. Assim, os níveis de TNF- $\alpha$  são regulados em diferentes estágios: transcrição, controle pós-transcricional da estabilidade do RNA, clivagem da forma de membrana para liberar a forma solúvel e expressão de receptores. Em adição à regulação e aos níveis de transcrição, há evidências de que taxas de síntese de TNF- $\alpha$  são também controladas pelo nível de alongação do mRNA, processamento e tradução (KROEGER *et al.*, 1999; HAJEER & HUTCHINSON, 2001).

Polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) foram descritos na região promotora nas posições -1031T/C, -863C/A, -857C/A, -851C/T, -419G/C, -376G/A, -308G/A, -238C/A, -162G/A, e -49G/A, além das posições -419, -163, -49 (estas últimas são raras em caucasianos). Ocorrem ainda as mutações por inserção de uma citosina na posição +70 no primeiro exon, substituição C→A na posição +488 no primeiro intron, deleção de uma guanina na posição +691 no primeiro intron, e no número de repetições de dinucleotídeos em microssatélites.

Para o polimorfismo da posição -308G/A, foi designado TNF1 o alelo A e TNF2 o alelo G. O TNF2 foi associado ao fenótipo de alto produtor dessa

citocina em diversos estudos (WILSON *et al.*, 1993). Alguns estudos apontam resultados interessantes em relação a doenças infecciosas (ALLEN, 1999), como Malária com comprometimento cerebral (McGUIRE *et al.*, 1994), Leishmaniose cutaneomucosa (CABRERA *et al.*, 1995) e Leishmaniose chagasi (KARPLUS *et al.*, 2002).

Estudos correlacionando o polimorfismo da posição -308G/A no gene do TNF- $\alpha$  e doenças têm apresentado discrepâncias, podendo ter para uma mesma patologia correlação ou não. Algumas explicações para o encontro dessas diferenças têm sido propostas como a variação do tipo celular usado no estudo, (BAYLEY *et al.*, 2001), além disso a região 5' do TNF- $\alpha$  é altamente polimórfica, ocorrendo desequilíbrios de ligação, o que pode dificultar estudos do papel de um SNP isolado (HAJEER & HUTCHINSON, 2001). Por exemplo, Wilson *et al.* em 1993 associaram o fenótipo TNF2 ao haplótipo A1, B8, DR3, Stogiu *et al.* em 1999 num estudo realizado em pacientes com Esclerose Múltipla na Sardenha, encontraram aumento de produção de TNF- $\alpha$  em linfócitos de sangue periférico após estímulo na presença do alelo DR4, mas não na presença de DR3, Morgun *et al.* em 2003 demonstraram desequilíbrio de ligação entre o alelo A na posição -308 do gene do TNF- $\alpha$  e os alelos HLA-A1 e HLA-B8 no grupo étnico de brancos e de mulatos no Brasil, e entre o mesmo alelo do TNF- $\alpha$ , porém com o alelo HLA-B72 no grupo de negros, e Bittencourt e colaboradores em 2001 concluíram num estudo com pacientes brasileiros com Hepatite autoimune, que a associação dessa doença com o TNF2 previamente observado é secundário a um desequilíbrio de ligação com HLA-DRB1\*0301.

#### 2.1.5 INTERFERON GAMA (IFN $\gamma$ )

O IFN- $\gamma$  tem papel importante contra viroses e patógenos intracelulares e na indução de resposta imune inflamatória (LIO *et al.*, 2002). É produzido quase exclusivamente pelos linfócitos T auxiliares (Th1) e pelas células NK depois de estimuladas (PRAVICA *et al.*, 1999). O IFN- $\gamma$  atua sobre os



monócitos e os macrófagos e os ativa aumentando os mecanismos necessários para a lise intracelular dos microrganismos fagocitados, aumentando sua atividade tumoricida e os induzindo a liberar ao exterior uma maior quantidade de TNF- $\alpha$  (BOEHM *et al.*, 1997). Os macrófagos ativados pelo IFN- $\gamma$  também aumentam a expressão de receptores para a porção Fc das IgG (Fc $\gamma$ R) e de antígenos HLA de classe II do MHC.

Quando ocorre um dano tissular maior durante o processo inflamatório, pode ser necessária a reparação com formação de fibrose. O IFN- $\gamma$  aumenta a síntese de colágeno e a sua deposição na matriz extra celular, além de aumentar a transcrição de outros genes da matriz como a fibronectina (CARTWRIGHT *et al.*, 1999).

O IFN- $\gamma$  é um polipeptídeo homodimérico de 34KDa (BOEHM *et al.*, 1997). O gene para IFN- $\gamma$ , no cromossomo 12q24.1, consiste de quatro exons e três íntrons, e contém um estimulador não específico dentro do primeiro íntron (GIEDRAITS & HILLERT, 1999). Foi descrito no homem um polimorfismo de número de repetições de dinucleotídeos CA, de comprimento variável, no primeiro íntron desse gene, a 875bp a jusante do sítio de início de transcrição da primeira região codificadora (HALLORAN & GOES, 1993).

Alguns trabalhos são divergentes em relação ao número de repetições de dinucleotídeos, variações que podem ser atribuídas aos diferentes métodos de detecção utilizados (AWATA, 1994; RUIZ-LINARES *et al.*, 1994; PRAVICA *et al.*, 1999).

Estudos sugerem que alguns desses polimorfismos estão associados com diferentes quantidades de secreção de IFN- $\gamma$  e, conseqüentemente, podem ter importância biológica em algumas doenças. Foram descritos cinco alelos diferentes desses microsátélites. A análise da seqüência mostrou que o alelo#1 corresponde a 11 repetições CA, o alelo#2 corresponde a 12 repetições, e os alelos #3, #4 e #5 têm 13, 14 e 15 repetições respectivamente.

Em outro estudo, os mesmos autores mostraram que a produção aumentada de IFN- $\gamma$ , definida pela resposta da estimulação de leucócitos do sangue periférico *in vitro* com concanavalina A, estava relacionada a presença do alelo#2 (PRAVICA *et al.*, 1999). Indivíduos homozigotos para o alelo#2 produziram mais IFN- $\gamma$  do que indivíduos com outras combinações de alelos.

Em um outro estudo foi verificada uma possível associação entre o alelo#2 com fibrose de enxerto em receptores de transplante de pulmão, confirmando seu papel como marcador de alta produção de IFN- $\gamma$  (AWAD *et al.*, 1999).

Posteriormente, Pravica e colaboradores (2000) mostraram haver correlação entre o alelo#2, e a presença do alelo T localizado como polimorfismo de mutação simples na posição +874(T/A) no sítio de início da tradução, coincidindo com um sítio de ligação NF-K $\beta$  que pode ser importante na indução de alta produção de IFN- $\gamma$ . Desta forma, tem sido sugerido que o polimorfismo T/A na posição +874, associado com o marcador CA microssatélite, influencia diretamente o nível da produção de IFN- $\gamma$ .

## 2.2 PANCREATITE AGUDA

O termo pancreatite aguda foi definido no Simpósio Internacional em Atlanta, no ano de 1992, como “um processo inflamatório do pâncreas com envolvimento variável de tecidos locais ou em sistemas de órgãos remotos” (GODINHO, 2000; PACHECO *et al.*, 2003). Em termos clínicos, a pancreatite aguda (PA) é uma doença que tem como substrato um processo inflamatório do pâncreas, decorrente da ação de enzimas inadequadamente ativadas, que causa edema, hemorragia e até necrose pancreática e peripancreática. Como repercussão sistêmica, o paciente pode apresentar hipovolemia, que nos casos mais graves poderá comprometer múltiplos órgãos e sistemas, e até mesmo levar a óbito (RAMOS, 2000).

### 2.2.1. EPIDEMIOLOGIA E FATORES ETIOLÓGICOS

Diversos fatores etiológicos já foram identificados na PA. A litíase biliar é considerada a causa mais comum, mas a PA pode ocorrer devido a traumas, drogas, causas infecciosas, vasculares e manuseio endoscópico (GUEDES *et al.*, 2006). Ainda assim, há uma parcela que permanece com a etiologia

desconhecida e é denominada idiopática (GODINHO, 2000; TRIVIÑO *et al.*, 2002).

Em 20% a 30% do total das pancreatites ocorre necrose, sendo que na forma grave a frequência é elevada. O curso clínico da PA apresenta duas fases: (1) a precoce ou “toxêmica” (até duas semanas), em que os principais sinais e sintomas são hipotensão, hipovolemia, íleo prolongado, oligúria, dispnéia ou a síndrome da disfunção múltipla de órgãos (MODS); e (2) a fase tardia em que predominam as complicações sépticas, locais ou sistêmicas. Em 50% dos pacientes com PA grave, há resolução espontânea do processo, e nos outros casos surge infecção dos tecidos necrosados. A sepse pode ocorrer na fase precoce, mas o risco maior é a partir da terceira semana. A sintomatologia é de ampliação e agravamento do quadro “toxêmico” e da MODS, com influência negativa na evolução da doença (RAMOS, 2000; CARNEIRO & BATISTA, 2004; FANTINI *et al.*, 2006).

Dentre as complicações que podem ocorrer, há o pseudocisto que surge em 10% a 20% dos doentes com PA grave e que, habitualmente, tem manifestações clínicas quando por rotura surge uma ascite pancreática, ou também por infecção, compressão extrínseca de órgão ou hemorragias. Outras complicações gastrointestinais podem ser observadas, como hemorragias, necrose cólica, perfurações ou fístulas (RAMOS, 2000; FANTINI *et al.*, 2006; FROSSARD *et al.*, 2008).

### 2.2.2. FISIOPATOLOGIA

A célula acinar é a unidade formadora dos ácinos, presentes na região exócrina do pâncreas, e responsável pela síntese das enzimas digestivas. As enzimas são armazenadas e excretadas na forma inativa. Alguns mecanismos contribuem para que estas enzimas se mantenham inativas, limitando assim danos decorrentes de sua ação no pâncreas. Entre eles, a impermeabilidade dos compartimentos intracelulares que as armazenam, impedindo a entrada de outras proteínas que as possam ativar e, também, o pH inadequado para sua ativação. Além disso, nesse grupo de enzimas há uma protease que degrada a

tripsina ativada (MOLERO *et al.*, 2003; LEUNG & IP, 2006, WEISS *et al.*, 2008).

Em modelo animal, foi comprovado que no início da indução da pancreatite é produzido um bloqueio da secreção enzimática apical na célula acinar e uma co-localização de enzimas lisossomais (ex: catepsina B) e zimogênios (ex: tripsinogênio) nas mesmas organelas. Esse mecanismo fornece as condições adequadas para a ativação dessas enzimas, iniciando a lise da membrana e das proteínas celulares (SALUJA *et al.*, 1997).

Uma hipótese para explicar como se inicia a PA é a ativação intracelular de tripsina. Esta ativação não seria limitada ou impedida pelos mecanismos de proteção da própria célula. Isso seria devido à deficiência destes mecanismos, ou por estes possuírem capacidade inferior à necessária para conter um processo de ativação dessa magnitude. Essa ativação de zimogênios levaria à destruição da célula acinar, estendendo o processo de autodigestão intra e peripancreático. O subsequente curso da PA resultaria do balanço entre as proteases ativadas e as proteases inibitórias. Ainda não são devidamente entendidos os processos que levam a essa ativação prematura (GODINHO, 2000; TRIVIÑO *et al.*, 2002; GUZMAN & RUDNICKI, 2006; ELFAR, 2007; WEISS *et al.*, 2008). Molero e colaboradores (2003) sugerem que essa seqüência de eventos seria uma das possíveis explicações, mas, também, referem-se a estudos experimentais nos quais a catepsina B não é requerida, bem como a outros estudos que mostram que a gravidade da PA é independente da ativação de tripsina.

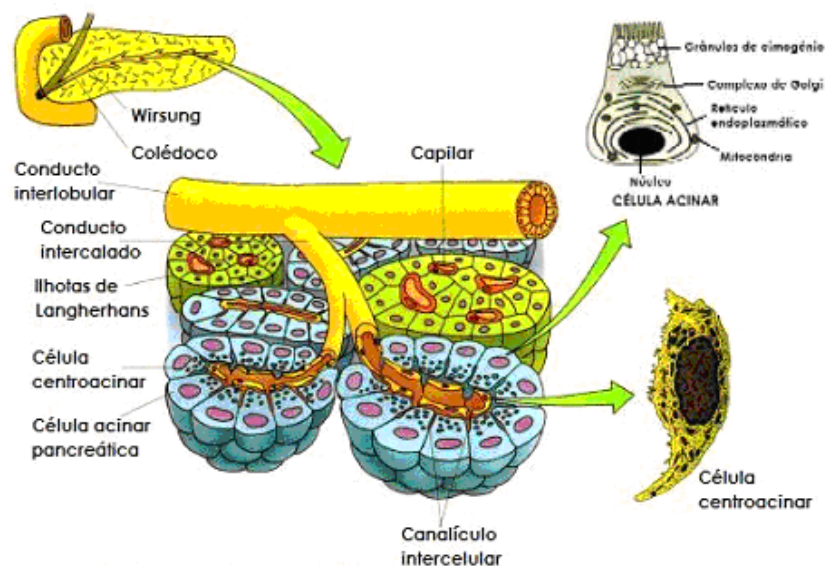


FIGURA 2: CONSTITUIÇÃO DE UM ÁCINO PANCREÁTICO  
 (<http://www.nuclear.radiologia.nom.br/bv/pt/carmina/pancreat/capit2.htm>)

De acordo com esse modelo descrito, a célula acinar, que está presente no pâncreas na forma inativa, seria ativada tornando-se capaz de liberar uma série de fatores, potencialmente lesivos de alcance local e sistêmico como fator ativador de plaquetas (Platelet activating factor - PAF), espécies de oxigênio reativo (reactive oxygen species - ROS), TGF- $\beta$ , óxido nítrico (NO), TNF- $\alpha$ , IL-6 e quimiocinas (MOLERO *et al.*, 2003; LEINDLER *et al.*, 2004; RAMUDO *et al.*, 2005). As quimiocinas secretadas atraem leucócitos, inicialmente neutrófilos e posteriormente mononucleares (KIMURA *et al.*, 2003). Os neutrófilos, cuja presença no início do processo da PA já é comprovada, controlam a atividade das células estelares mediante a secreção de citocinas e NO, e as metaloproteinases da matriz (MMP) degradam fibras de colágeno I, que estimula a sobrevivência de miofibroblastos ativados (MOLERO *et al.*, 2003).

Miofibroblastos são células residentes intersticiais que têm como precursoras as células estelares do pâncreas (CEP), e se localizam em área periacinar ou perivascular. As CEP possuem projeções em forma de estrelas com as quais estabelecem contato entre elas, com células acinares, ductais e endoteliais (MOLERO *et al.*, 2003). Estudos em cultura têm identificado numerosos fatores de crescimento, citocinas, hormônios, moléculas de sinalização intracelular e fatores regulatórios da ativação das CEP. São eles: citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, e TNF- $\alpha$ ), fatores de crescimento (PDGF e TGF- $\beta$ ),

angiotensina II e ROS liberadas pelas células vizinhas, e por leucócitos, recrutados em resposta ao dano pancreático. As CEP ativadas, por sua vez, podem produzir fatores autócrinos, tais como PDGF, TGF- $\beta$ , citocinas (IL-1, IL-6 e TRAIL) e ciclooxygenase-2 (COX-2), que podem perpetuar o fenótipo de células ativadas (APTE&WILSON, 2003; JASTER, 2004; OMARY *et al.*, 2007).

Após o evento inicial, a PA passa por três fases que são: (1) uma resposta inflamatória local; (2) uma resposta sistêmica, que pode resultar na falha de um ou múltiplos órgãos; e (3) mais tardiamente, pode ocorrer uma infecção pela translocação de bactérias intestinais. Pacientes com PA grave podem passar por todas as fases, mas, nos casos da PA leve, a doença pode ser resolvida na primeira fase, tendo repercussão apenas local (KINGSNORTH, 1997).

A inflamação tem um papel decisivo na evolução da PA. O recrutamento pancreático de células inflamatórias é um fenômeno precoce no agravamento da doença. Na PA experimental, a depleção dos leucócitos circulantes diminui a intensidade da lesão local e da resposta inflamatória sistêmica (GODINHO, 2000). Em alguns casos de PA, o estímulo leucocitário é excessivo levando a um importante acúmulo de leucócitos, principalmente neutrófilos, mas, também, macrófagos, monócitos e linfócitos. Estas células são responsáveis pela liberação de vários mediadores inflamatórios com ação local e sistêmica: elastase e fosfolipase A2 de tipo II, ROS e citocinas (GODINHO, 2000).

O PAF tem ação pró-inflamatória e atua como mediador da interação entre as células polimorfonucleares e células endoteliais, facilitando a migração das células polimorfonucleares ativadas para os tecidos. O PAF atua em concentrações muito baixas via receptor de superfície celular, e é um importante mediador das funções fisiológicas do pâncreas (KINGSNORTH, 1997; GODINHO, 2000).

As ROS não são produzidas por todas as células em condições normais; mas quando há uma demanda metabólica, é produzida a partir da cadeia respiratória mitocondrial ou de complexos enzimáticos localizados no citosol ou em membranas celulares. Alguns estudos têm mostrado a presença de elevada produção de ROS (GOUGH *et al.*, 1990) na fase inicial da pancreatite; as ROS também têm sido relacionadas à lesão acinar (RAU *et al.*,

2000). Além da produção na fase inicial, as ROS podem ser formadas durante todo o processo da pancreatite em decorrência da morte celular, lesão endotelial ou produzida por células polimorfonucleares presentes no local (MOLERO *et al.*, 2003).

As ROS ativam miofibroblastos, aumentam a permeabilidade vascular observada na pancreatite e favorecem a adesão leucocitária pela indução da expressão de moléculas de adesão (MOLERO *et al.*, 2003). As ROS levam também ao consumo das defesas celulares antioxidantes, o que contribui para o agravamento da PA (GODINHO, 2000). Tecidos distantes do pâncreas podem ser lesados diretamente pela liberação e difusão sanguínea de xantina-oxidase, cuja atividade gera superóxido (MOLERO *et al.*, 2003).

A fosfolipase A<sub>2</sub> hidrolisa fosfolípidos de membrana celular produzindo ácido araquidônico que, por sua vez, é convertido em prostaglandinas e leucotrienos com potentes ações vasculares, contribuindo para o agravamento do processo inflamatório local, provocando, na presença de sais biliares, necrose parenquimatosa e adiposa grave. Contribui, também, para as complicações sistêmicas da PA, degradando a lecitina, principal componente do surfactante alveolar e pela ativação do PAF, componente da membrana lipídica, e da formação de prostaglandinas (GODINHO, 2000).

Um estudo mostrou que a resposta proliferativa de linfócitos periféricos com mitógenos nas fases iniciais da PA está diminuída (PEZZILLI *et al.*, 1997). A ativação de linfócitos não afeta os eventos iniciais, que desencadeiam o dano pancreático, mas modula a resposta sistêmica, em particular o dano pulmonar causado pela PA (PEZZILLI *et al.*, 1997; MAYER *et al.*, 1999).

Em pacientes com PA foi identificada uma depleção de linfócitos, sendo mais acentuada em pacientes com PA grave (UEHARA *et al.*, 2003; PIETRUCZUK *et al.*, 2006), assim como a ocorrência de fraca ativação de células B em sangue periférico (PEZZILLI *et al.*, 2003). Uma hipótese para essa diminuição de linfócitos no sangue periférico dos pacientes com PA seria a migração dessas células para os sítios da inflamação, incluindo o pâncreas e outros tecidos, como pulmão e rim, como parte da SIRS (Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica). Outra hipótese seria a eliminação dessas células por apoptose ou, ainda, a ocorrência de ambos os processos (UEHARA *et al.*, 2003).

A célula acinar, após ser danificada de forma letal, morre por necrose ou apoptose. A apoptose foi predominantemente encontrada na forma leve da pancreatite e a necrose na forma grave. A apoptose das células acinares causa menos destruição para o pâncreas que a necrose, e os dois processos podem ser induzidos por neutrófilos (LEINDLER *et al.*, 2004; GUZMAN & RUDNICKI, 2006).

Na porção exterior do pâncreas é encontrada gordura, a qual varia quantitativamente nos diferentes indivíduos. Essa gordura pode necrosar durante o processo da PA, devido às enzimas lipolíticas liberadas pelas células acinares lesadas. Para resolução da necrose gordurosa, irá influenciar a localização e tamanho da área afetada. Pequenas áreas de necrose gordurosa na superfície do pâncreas caracterizam a pancreatite leve, e é resolvida completamente. O material necrótico rico em lipídios é fagocitado por macrófagos, e depois são substituídos por pequenos focos de tecido fibrótico (KLÖPPEL & MAILLET, 1993).

Quando a área necrótica liquefeita é maior - excede 4 cm de diâmetro - caracteriza a pancreatite grave, é demarcada por macrófagos e pode, também, ser reabsorvida rapidamente por essas células. Se essa área ultrapassar 5,0cm de diâmetro, a resolução não é espontânea, e os macrófagos são substituídos por finas camadas de tecido granuloso entre 10 e 20 dias da doença. Após 20 a 30 dias, o tecido granuloso, rico em hemossiderina, forma a cápsula fibrótica, a qual gradualmente aumenta sua espessura e forma uma grossa parede visível. Assim, está desenvolvido o pseudocisto. O fato de muitos pseudocistos conterem suco pancreático sugere comunicação com o sistema de ductos pancreáticos. Isso pode ser o motivo pelo qual o pseudocisto aumenta de tamanho com o tempo, podendo comprimir ou perfurar tais estruturas, como os ductos biliares, duodeno, estômago, vasos sanguíneos, ou peritônio (KLÖPPEL & MAILLET, 1993).

Se ocorrer infecção com bactérias da necrose gordurosa, no momento em que as áreas necróticas são demarcadas, ocorre a formação de uma fina camada de macrófagos ou de tecido granular. A infecção das cavidades pode evoluir para peritonite (KLÖPPEL & MAILLET, 1993).



## 2.2.2. CITOCINAS NA PA

### 2.2.3.1. FATOR DE NECROSE TUMORAL- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

O TNF- $\alpha$  e o IL-1 $\beta$  são produzidos predominantemente por macrófagos e detectados precocemente após indução de PA experimental. Suas ações são sinérgicas. Estas citocinas não intervêm na ativação dos zimogênios, mas são os principais mediadores da cascata inflamatória subsequente e do choque por SIRS (GODINHO, 2000).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina produzida em resposta a numerosos estímulos, e induz a inflamação aguda pelo aumento da permeabilidade endotelial, recrutamento de células inflamatórias e estímulo para liberação de superóxido e citocinas pelos neutrófilos. Alguns estudos clínicos e experimentais têm mostrado que as concentrações séricas do TNF- $\alpha$  e do seu receptor estão aumentadas em pacientes com PA, e parece haver uma associação deste aumento com a gravidade da doença (GRANELL *et al.*, 2004). Devido à vida-média curta desta citocina, sua quantificação em sangue periférico é difícil (DE BEAUX *et al.*, 1996), por isso é detectável apenas em 10% a 40% dos pacientes. O TNF- $\alpha$  possui ações autócrinas, parácrinas e endócrinas (KINGSNORTH, 1997). Granell e colaboradores (2004) em estudo experimental de PA avaliaram a cinética do TNF- $\alpha$  e concluíram que a presença do seu receptor solúvel teria um efeito protetor, por limitar a ação excessiva do TNF- $\alpha$ .

### 2.2.3.2. INTERLEUCINA-1 (IL-1)

A IL-1 possui muitas das propriedades do TNF- $\alpha$ . A medida do seu antagonista natural (IL-1ra) pode ser utilizada para avaliar o grau de estímulo ocorrido da IL-1, já que a sua detecção é prejudicada por sua curta vida-média (KINGSNORTH, 1997). A IL-1 é liberada durante a inflamação aguda e a

inflamação crônica, e é responsável por muitos sintomas durante o SIRS (FROSSARD *et al.*, 2001).

#### 2.2.3.3. INTERLEUCINA-6 (IL-6)

O IL-6 é o principal mediador da resposta de proteínas de fase aguda. Nas primeiras horas da PA sua concentração sérica está aumentada e, entre três e seis horas após o início do processo, atinge o maior pico, sendo anterior à elevação da concentração sérica da proteína C reativa (KINGSNORTH, 1997; MAYER *et al.*, 2000; BHATNAGAR, 2003). Em um estudo com cultura de células, foi mostrada a presença de inibidores de IL-6 em pacientes com PA, diferentemente dos achados em pacientes com sepse. Com isso, os autores sugeriram que poderiam existir diferentes vias de liberação de citocinas pró-inflamatórias, ou uma nova ação anti-inflamatória do soro desses pacientes (KOUSSOULAS *et al.*, 2006).

#### 2.2.3.4. INTERLEUCINA-10 (IL-10)

A IL-10 tem ação protetora ao regular negativamente as citocinas pró-inflamatórias e prevenir maior lesão tecidual (GODINHO, 2000). Algumas funções dos macrófagos são inibidas, como a produção de IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  e liberação de radicais livres (KINGSNORTH, 1997; CHEN, 1999); também diminui a resposta imune celular suprimindo a produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  (CHEN, 1999). A IL-10 é um fator prognóstico nas primeiras 24 horas de PA, sendo mais elevado em doentes com PA leve (CHEN, 1999; MAYER *et al.*, 2000; GODINHO, 2000).

Em estudo com camundongos IL-10 *knock out* foi observado que eles apresentam aumento da produção de citocinas inflamatórias, e neles é freqüente o aparecimento de doenças inflamatórias (CONTI *et al.*, 2003). Em outro estudo experimental, com ratos IL-10 *knock out*, foi observado que as

células fagocitárias escapam de seu controle habitual e infiltram-se maciçamente no intestino, entrando em contato com as endotoxinas das enterobactérias comensais (KOTENKO, 2002). Esses ratos não podem controlar a produção de citocinas pelos macrófagos estimulados com endotoxinas. Por essa razão, têm níveis elevados de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8 no soro. Histologicamente, esta doença dos ratos simula algumas doenças inflamatórias do tubo digestivo dos humanos (KOTENKO, 2002).

## 2.3 PANCREATITE CRÔNICA

A pancreatite crônica (PC) é definida pela classificação de Marseille-Rome, de 1988, como “doença inflamatória crônica do pâncreas caracterizada pela destruição irreversível do parênquima exócrino e fibrose e ao menos no estágio avançado, a destruição do parênquima endócrino” (SARLES *et al.*, 1990). A PC caracteriza-se por episódios recorrentes de dor abdominal, acompanhadas ou não de vômito, diarreia, febre leve a moderada e aumento dos níveis de amilase (MITCHELL *et al.*, 2003).

### 2.3.1. EPIDEMIOLOGIA E FATORES ETIOLÓGICOS

O agente etiológico mais freqüente é o álcool, mas há outros fatores, como distúrbios metabólicos (hipertrigliceridemia, hiperparatideoidismo), nutricionais (desnutrição, consumo de mandioca, etc) (KLÖPPEL & MAILLET, 1994; ETEMAD & WHITCOMB, 2001; WITT *et al.*, 2007) e mecânicos (pâncreas *divisum*, obstrução de ducto por tumor, etc), além de aspectos predisponentes genéticos, respondendo por uma parcela dos casos (MITCHELL *et al.*, 2003). Aproximadamente 20% dos pacientes não têm causa detectada. São identificadas particularidades de acordo com hábitos, estilos de vida e condições socioeconômicas; por exemplo, em países tropicais, e

especialmente na Índia, são diagnosticados com maior freqüência, PC por fatores nutricionais (KLÖPPEL & MAILLET, 1994).

Na Europa, cerca de 70% dos casos de PC são de etiologia alcoólica (MITCHELL *et al.*, 2003). De acordo com o “II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil: Estudo envolvendo 108 Maiores Cidades do País, 2005” promovido pela Secretaria Nacional Antidrogas (Senad), 12,3% dos indivíduos com idades entre 12 e 65 anos são dependentes de bebidas alcoólicas. Na região Nordeste, a proporção foi de 13,8%. Os dados deste estudo, quando comparados aos do “I Levantamento Domiciliar” realizado em 2001, apontam o aumento do consumo de álcool em faixas etárias cada vez mais precoces (<http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/index.php>).

Nos Estados Unidos da América é estimado que para o indivíduo apresentar uma PC sintomática deve beber mais que 80 g de álcool/dia, por um mínimo de 6 a 12 anos, porém o risco de desenvolver a doença aumenta com maiores quantidades consumidas, como também com maior duração do tempo de ingesta (CHOWDHURY & GUPTA, 2006).

A PC afeta predominantemente homens jovens (25 a 40 anos), sendo na maioria alcoolistas. A PC idiopática ocorre geralmente numa faixa etária mais baixa (KLÖPPEL & MAILLET, 1994; WITT *et al.*, 2007). Em países tropicais, a PC é uma doença predominantemente de jovens, iniciando geralmente na primeira década de vida e é comum igualmente em homens e mulheres (KLÖPPEL & MAILLET, 1994).

Estudo realizado no Ambulatório de Gastroenterologia da Universidade Federal da Bahia identificou a prevalência etiológica nos pacientes com PC como sendo: etilismo em 87,4% dos pacientes, nutricional em 4,2%, idiopática calcifica em 4,2% e atrófica sem calcificações em 4,2% (GUEDES, 2006). Esses dados se assemelham aos encontrados em São Paulo e Belo Horizonte, onde a prevalência do etilismo foi de 93,6% e 85,4%, respectivamente (DANI, 1990).

### 2.3.2. FISIOPATOLOGIA

Na PC, o pâncreas vai sendo substituído por tecido fibrótico. A fibrose é um processo dinâmico e reversível nos estágios iniciais (ETEMAD & WHITCOMB, 2001; PHILLIPS *et al.*, 2003; WITT *et al.*, 2007). O evento inicial que induz a fibrogênese na PC é a necrose do tecido gorduroso e a reabsorção das células mortas pelos macrófagos. Os macrófagos e células ductais são os principais produtores de TGF- $\beta$  e PDGF-B, que causam ativação e proliferação dos fibroblastos/células estelares residentes na vizinhança do dano. Estes fibroblastos transformam-se em miofibroblastos (KLÖPPEL, 1991; APTE *et al.*, 1999; DETLEFSEN *et al.*, 2006), e liberam citocinas que vão induzir a produção e deposição da matrix extracelular (LINDLEY, 2006).

Muitas desordens fibróticas têm um agente etiológico infeccioso, como bactéria, vírus, fungo, ou parasita direcionando a inflamação crônica e o desenvolvimento da fibrose (WYNN, 2008), porém, na PC, até o momento, não foi identificado nenhum desses agentes participando do processo.

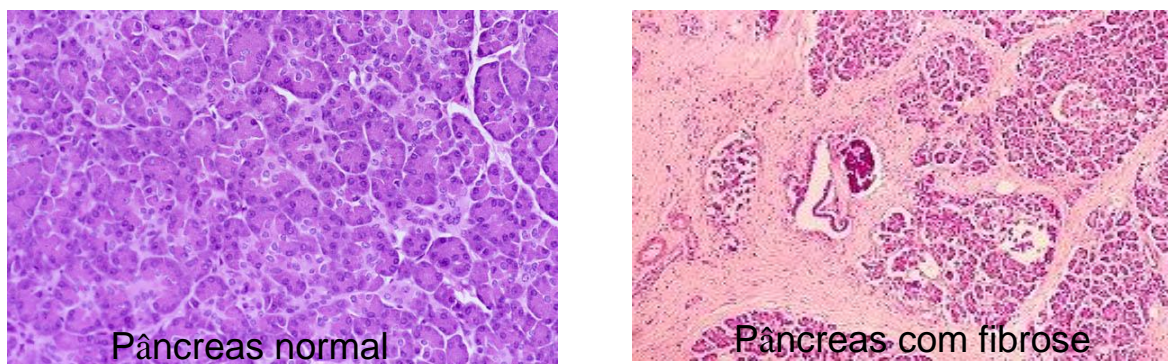


FIGURA 3: CORTE HISTOLÓGICO DE TECIDO PANCREÁTICO NORMAL E COM FIBROSE  
( [pathology.mc.duke.edu/.../pancreas.jpg](http://pathology.mc.duke.edu/.../pancreas.jpg) )

As quimiocinas contribuem na formação da fibrose, atraindo leucócitos que irão cooperar com as citocinas pró-fibróticas no desenvolvimento da fibrose, recrutando miofibroblastos, macrófagos e outras células efetoras para o local do dano (WITT *et al.*, 2007, WYNN, 2008).

As reações de inflamação crônica são caracterizadas por um infiltrado de células, incluindo macrófagos, linfócitos, eosinófilos e plasmócitos (WYNN, 2008).

As complicações que ocorrem na PC incluem formação de pseudocistos, cálculos pancreáticos, cálculos biliares, estenose duodenal, hipertensão portal com varizes, e maior risco de câncer pancreático (ETEMAD & WHITCOMB, 2001; MITCHELL *et al.*, 2003). Guedes e colaboradores (2006) realizaram um estudo prospectivo em pacientes com PC, onde ressaltaram que as complicações indiretas decorreram principalmente do Diabetes, dentre elas pé-diabético com amputação, insuficiência renal crônica, escleroderma diabético, etc. Das complicações diretas, a mais freqüente foi pseudocisto em 33,3% dos pacientes; 4,2% dos pacientes acompanhados no estudo foram a óbito.

### 2.3.3. CITOCINAS NA PC

#### 2.3.3.1. FATOR DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO- $\beta$ 1 - (TGF- $\beta$ 1)

Um estudo em pâncreas humano normal identificou a presença do TGF- $\beta$ 1 em células acinares, dos ductos e das ilhotas, como também modulando, *in vitro*, porções da região exócrina e endócrina da glândula (SANVITO *et al.*, 1994).

Detlefsen e colaboradores (2006) evidenciaram que a fibrogênese na PC alcoólica é iniciada pela infiltração do tecido pancreático por macrófagos e outras células inflamatórias que são atraídas para o tecido danificado e, com os miofibroblastos, estimulam a produção de citocinas fibrogênicas.

Sanvito e colaboradores (1995) mostraram em camundongos transgênicos, altos produtores de TGF- $\beta$ 1, o desenvolvimento de lesões que afetavam a porção exócrina da glândula. Estes camundongos, quando adultos, apresentaram fibrose maciça do pâncreas, sendo a maioria dos ácinos substituída por tecido fibrótico e adiposo. Essa lesão era muito semelhante às descritas na PC, sugerindo que essa citocina estaria envolvida na doença.

Em estudo imunohistoquímico de pâncreas usando um anticorpo monoclonal anti-TGF- $\beta$ 1 na sua forma latente (intracelular), Slater e colaboradores (1995) verificaram a expressão aumentada desta citocina nos pacientes com PC, quando comparados com um grupo de indivíduos sem PC. No tecido pancreático não inflamado, a forma latente do TGF- $\beta$ 1 era expressa por células isoladas localizadas predominantemente na junção entre ductos e ácinos, ou nas bordas internas dos ácinos. Na PC, a maioria das células epiteliais dos ductos era corada positivamente. Nos casos obstrutivos, todas as células do epitélio adjacentes à lesão eram coradas, e nas regiões distantes havia células isoladas coradas. Nos casos com etiologia alcoólica e idiopática, a presença de células coradas para o TGF- $\beta$ 1 correlaciona-se com as zonas de lesão, havendo poucas células coradas nas áreas menos atingidas. Estes achados estão de acordo com provável atuação do TGF- $\beta$ 1 na formação da fibrose.

Satoh e colaboradores (1998) confirmaram esse achado, além de verificarem o aumento de expressão dos receptores T $\beta$ RI e T $\beta$ RII, em estudo realizado posteriormente.

Van Laethem e colaboradores (1996) mostraram que repetidas injeções de TGF- $\beta$ 1 recombinante em camundongos após episódios recorrentes de PA levavam à fibrose pancreática, o que está em coerência com a hipótese da seqüência necrose-fibrose (KLOPPEL & MAILLET, 1992). Por outro lado, em um estudo experimental, os autores verificaram que o TGF- $\beta$  pode inibir a fibrose pancreática e também proteger o pâncreas contra danos crônicos, atuando na prevenção da apoptose de células acinares (NAGASHIO *et al.*, 2004).

#### 2.3.3.2. INTERLEUCINA -6 (IL-6)

Bamba e colaboradores (1994) realizaram um estudo em pacientes com PC, sem tratamento prévio ou apenas em uso de enzimas digestivas, e avaliaram os níveis séricos de IL-1 $\beta$  e de IL-6 e sua possível correlação com a

PC. Com os resultados obtidos, os autores sugerem que o nível sérico de IL-1 $\beta$ , e não da IL-6, pode ser correlacionado com PC.

#### 2.3.3.3. INTERLEUCINA -10 (IL-10)

A IL-10 tem propriedades antiproliferativas e antifibróticas, tendo sido verificado que é liberada durante o curso da PA experimental, promovendo uma ação que limita a severidade, regulando para que ocorra menor liberação dos mediadores pró-inflamatórios (VAN LAETHEM *et al.*, 1998; DEMOLS *et al.*, 2001).

#### 2.3.3.4. INTERLEUCINA -17 (IL-17)

A IL-17 desempenha um papel importante em muitas doenças inflamatórias e autoimunes, como artrite reumatóide, doenças inflamatórias intestinais, esclerose múltipla, órgão aloenxerto rejeição, psoríase, a inflamação das vias aéreas, e crescimento tumoral. É secretada por um subtipo de células T CD4+, que são denominados T helper 17 (TH17). É também produzida por algumas células T CD8+ e as células T expressando  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$  receptores de células T (TAKAYA *et al.*, 2002; STEINMAN, 2007; OUYANG *et al.*, 2008; GE&YOU, 2008)

Andoh e colaboradores (2002), investigaram os efeitos de citocinas derivadas de células TCD4+ sobre secreção pancreática de quimiocina miofibroblastos periacinares em humanos. Identificaram que a IL-17 induz um aumento de secreção de IL-8 e MCP-1, e que a IL-17 e o IFN- $\gamma$  aumentam a secreção de IL-8 e de MCP-1. Estes resultados indicariam uma ligação entre a imunidade mediada por células e a resposta inflamatória no pâncreas.



## 2.4 ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE CITOCINAS E PANCREATITES

Vários estudos têm sido realizados com polimorfismo no gene *TNF- $\alpha$*  em pacientes com PA em diferentes grupos populacionais. Em pacientes chineses, foi identificada maior suscetibilidade de choque séptico nos pacientes graves que tinham o alelo *TNF2* (ZHANG *et al.*, 2003). Em pacientes ingleses com PA leve e grave não foi identificada associação com os polimorfismo do gene do *TNF- $\alpha$*  e do *IL-10* (SARGEN *et al.*, 2000). Em estudo com pacientes com PA de etiologia alcoólica na Finlândia, também não foi identificada associação com polimorfismo do gene do *TNF- $\alpha$*  (TUKIAINEN *et al.*, 2008). Outro estudo, realizado na Hungria, identificou uma frequência maior do genótipo A/G nos pacientes com PA grave em relação à leve (BALOG *et al.*, 2005).

Powell e colaboradores (2000) analisaram o polimorfismo do *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$*  e *IL-1RA* em pacientes com PA de um hospital de Edimburgo. Não encontraram associação, mas, as dosagens de *IL-1 $\beta$*  e *IL-1RA* nos pacientes com PA mais grave foram mais baixas. Outros estudos foram realizados em pacientes com PA e o polimorfismo no gene da *IL-1*, mas, não mostraram associação nem em pacientes chineses (ZHANG *et al.*, 2005), nem em ingleses (SMITHIES *et al.*, 2000).

Zhang e colaboradores (2005) não evidenciaram diferença de frequências dos polimorfismo de *IL-10* entre pacientes com PA leve, grave com e sem choque séptico.

A análise de polimorfismo do *TNF- $\alpha$*  e da *IL-10* em alemães com PC não mostrou associação, mas, o alelo *TNF- $\alpha$*  -238A estava em maior frequência no grupo de pacientes com PC hereditária e não nas outras formas (BERANEK *et al.*, 2003).

Howell e colaboradores (2005) analisaram a frequência dos polimorfismos de *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-8*, *TNF- $\alpha$* , *TGF- $\beta$ 1* em pacientes com PC, e não sendo observadas diferenças.

Farkas e colaboradores (2007) avaliaram a relevância do polimorfismo de TGF- $\beta$ 1, IL-8, TNF- $\alpha$ , além da dosagem de TGF- $\beta$ 1 plasmática em pacientes com PC e controles pareados quanto à idade e gênero. Apesar de não haver associação, os autores identificaram uma maior frequência do alelo T no TGF- $\beta$ 1 nesses pacientes. Ao comparar, ainda, os pacientes com genótipo TT e TC com as concentrações, tiveram maiores concentrações de TGF- $\beta$  que os controles. Estudo anterior (SCHENEIDER *et al.*, 2004) já tinha apontado uma tendência dos pacientes com PC terem o alelo T do TGF- $\beta$ 1 (+869), assim como nosso grupo no estudo inicial com indivíduos com PC também apontar essa tendência (BENDICHO *et al.*, 2005).

Até o momento, não foi identificado nenhum estudo abordando semelhanças e diferenças entre pacientes com PA e pacientes com PC, assim, a realização deste estudo poderá contribuir na ampliação do conhecimento dessas patologias.

### 3 OBJETIVOS

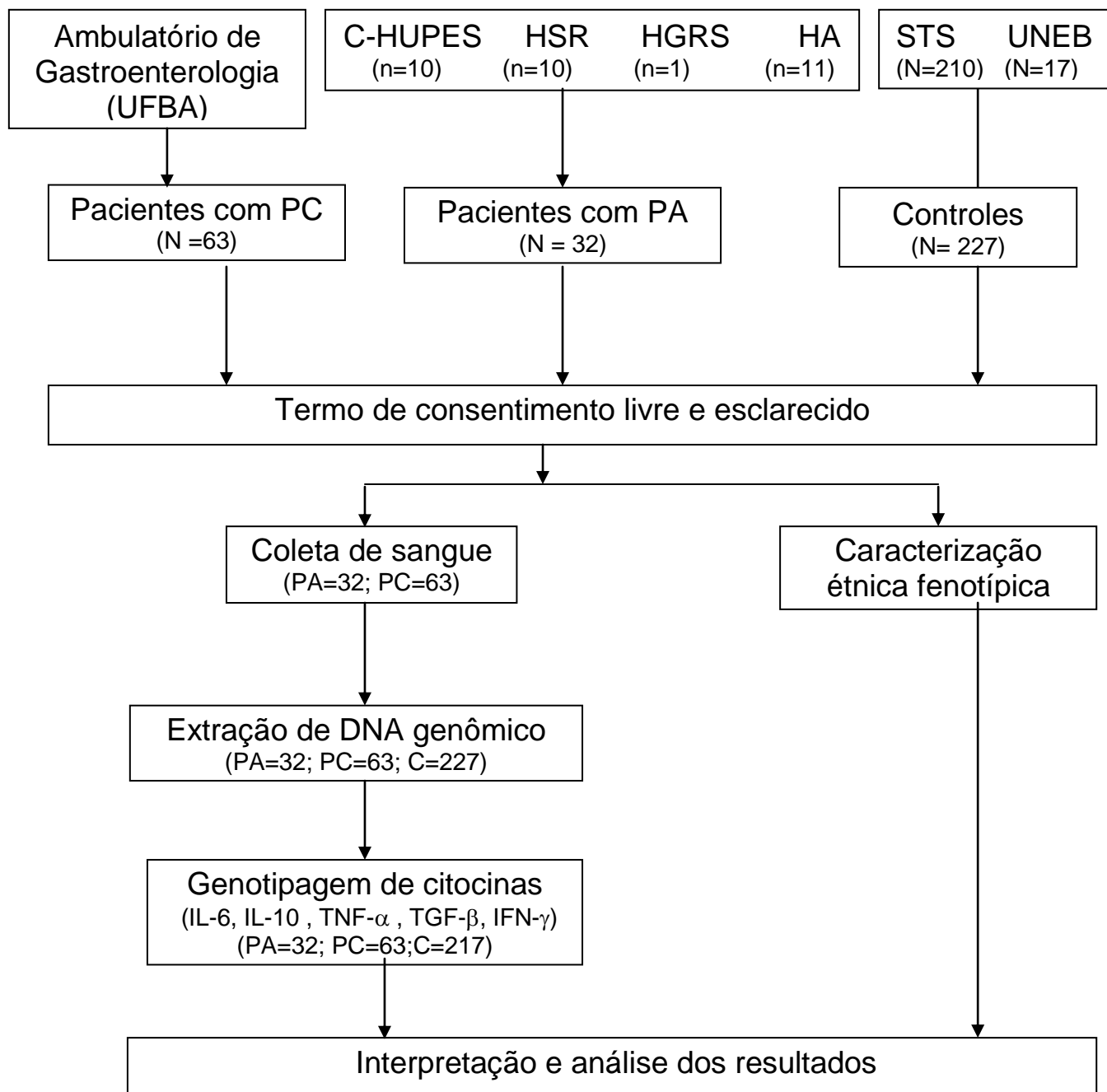
#### OBJETIVO GERAL:

Avaliar o possível papel das citocinas envolvidas na inflamação (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 e INF- $\gamma$ ), na predisposição genética e na patogênese das pancreatites crônica e aguda.

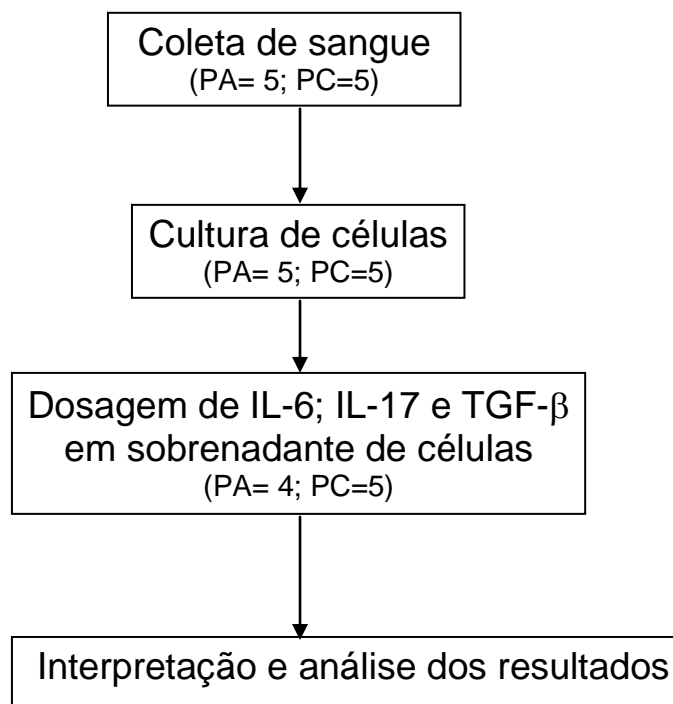
#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Descrever as freqüências alélicas, genótípicas e dos fenótipos previstos de polimorfismos genéticos das citocinas IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 e INF- $\gamma$  em uma amostra de indivíduos com pancreatite aguda;
- ✓ Comparar as freqüências observadas dos polimorfismos em um grupo de pacientes com pancreatite aguda com aquelas observadas em um grupo controle;
- ✓ Comparar as freqüências observadas dos polimorfismos em um grupo de pacientes com pancreatite aguda e as freqüências observadas em indivíduos com pancreatite crônica com mesma composição étnica;
- ✓ Avaliar a produção de IL-6, IL-17 e TGF- $\beta$ 1, “in vitro”, de células de sangue periférico de pacientes com pancreatite aguda, sob diferentes estímulos;
- ✓ Avaliar a produção de IL-6, IL-17 e TGF- $\beta$ 1, “in vitro”, de células de sangue periférico de pacientes com pancreatite crônica, sob diferentes estímulos;
- ✓ Comparar a produção de IL-6, IL-17 e TGF- $\beta$ 1, “in vitro”, de células de sangue periférico de pacientes com pancreatite aguda com as de pacientes com pancreatite crônica.

## 4. DELINEAMENTO DO ESTUDO



## DELINEAMENTO DO ESTUDO PILOTO



## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. SELEÇÃO DE PACIENTES

#### 5.1.1. GRUPO DE PANCREATITE AGUDA

O grupo de estudo foi composto por 32 indivíduos com Pancreatite aguda, diagnosticados no período de maio de 2005 a março de 2008, nos hospitais: Complexo Universitário Professor Edgar Santos da UFBA (C-HUPES), Geral Roberto Santos (HGRS), São Rafael (HSR) e Aliança (HA).

Os casos de PA foram definidos de acordo com os critérios de inclusão que consistiram em dor e/ou distensão abdominal e elevação dos níveis séricos de amilase e/ou lipase em níveis acima de três vezes os valores de referência para os métodos empregados.

Foram excluídos os pacientes com idade inferior a 18 anos e superior a 75 anos, que apresentavam história de trauma abdominal nos sete dias precedentes ou co-morbidade prévia decorrente de doença crônico-degenerativa, que referiam consumo de bebidas alcoólicas superior a 80g/dia (homens) ou 40g/dia (mulheres) por mais de quatro anos, com diagnóstico prévio de PC ou com alterações em exames de bioimagem que indiquem PC.

#### 5.1.2 GRUPO DE PANCREATITE CRÔNICA

O grupo foi composto por 63 pacientes diagnosticados no ambulatório de Pâncreas do C-HUPES.

Os casos de Pancreatite crônica foram definidos por critérios clínicos (dor abdominal e/ou diabetes e/ou esteatorréia), associados a critérios de bioimagem (raio X, ultra-sonografia, tomografia computadorizada ou colangiopancreatografia retrógrada endoscópica mostrando dilatação de

Wirsung e/ou amputação de ramos secundários dos canais secretórios do pâncreas e/ou calcificações pancreáticas).

## 5.2 SELEÇÃO DO GRUPO CONTROLE

### 5.2.1. CONTROLE PAREADO PARA PANCREATITE AGUDA

Para permitir compor um grupo controle pareado para o grupo de estudo de PA, de acordo com o gênero, idade e etnia, foram recrutados doadores de sangue voluntários no Serviço de Transfusão de Sangue – STS, e participantes de um grupo da “Terceira Idade” atendidos na Universidade do Estado da Bahia (UNEB). Este grupo foi constituído de 64 indivíduos.

### 5.2.2. CONTROLES PARA PANCREATITE CRÔNICA

O grupo de controles foi constituído de 210 doadores voluntários no Serviço de Transfusão de Sangue – STS.

## 5.3. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E PRÉ-ESCLARECIDO

Foi critério de inclusão a autorização formal com assinatura do termo de consentimento livre e pré-esclarecido, após explicação acerca do estudo, para todos os participantes (anexo 2).

## 5.4. COLETA DE SANGUE

Foi coletado de cada indivíduo, de maneira estéril, 5,0 mL de sangue em tubo contendo EDTA 0,5M para obtenção de DNA genômico. Para a

realização da cultura de células foram coletados 10 mL de sangue em tubo contendo heparina sódica.

## 5.5. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

O DNA genômico foi extraído a partir da camada de leucócitos do sangue periférico (*buffy coat*) utilizando o Kit EZ DNA (Biosystems). Em um tubo de *ependorf* de 1,5 mL foi adicionado 1,0 mL de solução de lise de eritrócitos (Sacarose 1,6M; Triton X-100 1M,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ), acrescentado 250  $\mu$ L do *buffy-coat* e, então, misturado vigorosamente no vortex por 30 segundos. Essa mistura foi centrifugada a 11.000 rpm por três minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso com agitação no vortex. Esta etapa do procedimento foi repetida mais uma vez. Foi adicionado à suspensão 500  $\mu$ L de EZ DNA (solução detergente de Isoticianato de guanidina). A mistura foi homogeneizada no vortex e incubada à temperatura ambiente por cinco minutos. Em seguida foi acrescentado 500  $\mu$ L de etanol 99% (v/v) gelado à suspensão e realizada a homogeneização da mesma, por inversão, aproximadamente 10 vezes. Após um período de incubação de três minutos à temperatura ambiente, a solução foi centrifugada a 11.000 rpm por 3 minutos e, posteriormente, foi desprezado o sobrenadante. Ao sedimento foi adicionado 500  $\mu$ L de etanol 95 % (v/v) gelado, e após centrifugação e remoção do sobrenadante, o tubo de *ependorf* contendo o DNA extraído foi colocado em termobloco a 47°C por 10 minutos para a evaporação do álcool. Na etapa seguinte, o DNA foi ressuspenso em 100 mL de água destilada a 47°C e homogeneizado com o auxílio do vortex. Para evitar presença de álcool residual na amostra a solução de DNA foi colocada no termobloco a 47°C por 15 minutos com a tampa do tubo de *ependorf* aberta e depois mais 30 minutos com a tampa fechada. O material foi armazenado a -20°C até o momento do uso.



## 5.6. GENOTIPAGEM DE CITOCINAS

### 5.6.1. TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 E TNF- $\alpha$

Foi usado o kit para genotipagem de citocinas da One Lambda Incorporation - "Cytokine Genotyping Tray", contendo, cada um, 16 tubos de PCR sendo um tubo controle negativo e 15 tubos com dois pares de iniciadores: um par com seqüências específicas que amplificam seletivamente regiões regulatórias polimórficas dentro de genes que codificam TNF- $\alpha$  (-308G/A), TGF- $\beta$ 1 (10C/T, 25C/G), IL-10 (-1082A/G, -819T/C, -592A/C), IL-6 (-174C/G) e IFN- $\gamma$  (874T/A); o segundo par de iniciadores amplifica uma seqüência controle.

A mistura para as reações de PCR (*Mix*) foi preparada conforme as instruções do fabricante: 180  $\mu$ L de D-Mix (solução fornecida pelo fabricante, contendo dNTPs, sal sódico de vermelho de fenol, sacarose, gelatina, KCl, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, Tris.HCl), aos quais foram adicionados cerca de 1,9  $\mu$ g de DNA teste e 5U de Taq polimerase. Após misturar os reagentes com auxílio de um agitador de tubos, 10  $\mu$ L do *Mix* foram distribuídos em cada um dos tubos, exceto no tubo controle negativo, ao qual tinha sido adicionado o *Mix* sem DNA teste. Os tubos foram, então, selados com filme apropriado (termo-resistente, fornecido pelo fabricante) e colocados no termociclador, o qual foi previamente programado com os seguintes parâmetros: um ciclo de 96°C por 130 segundos seguidos de 63°C por 60 segundos; nove ciclos de 96°C por 10 segundos e 63°C por 60 segundos; vinte ciclos de 96°C por 10 segundos, 59°C por 50 segundos e 72°C por 30 segundos; ciclo final de 4°C.

Depois do processo de PCR, os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados por coloração com brometo de etídio e exposição à luz ultravioleta. O gel de agarose 2,5% foi preparado com 0,75g de agarose (Invitrogen), 30 mL de tampão TBE1X (Tris-Borato 89mM; EDTA 2mM pH 8.0) e 0,05  $\mu$ g/mL de brometo de etídio. A cuba de eletroforese utilizada foi desenvolvida pela One Lambda de forma a permitir a análise concomitante de 96 produtos de PCR em

um curto tempo de migração; assim, em cada gel, foram analisados os resultados de PCR de seis diferentes amostras de DNA (16 reações para cada amostra). O gel foi recoberto com 10,0 mL de TBE 1X contendo 0,05 µg/mL de brometo de etídio e todo conteúdo de cada reação de PCR (10 µL) foi transferido para o poço correspondente. A corrida eletroforética foi então realizada a 120-130V (~30 mA) durante 4 a 5 minutos, ou até que o corante (vermelho de fenol) migrasse cerca de dois terços da distância entre duas linhas de poços no gel.

A interpretação dos resultados de PCR-SSP é baseada na presença ou ausência de um fragmento de DNA específico amplificado. Desde que a amplificação durante a PCR pode ser afetada por vários fatores (erro de pipetagem, baixa qualidade do DNA, presença de inibidores, etc.) um par de iniciadores-controle é incluído em cada reação de PCR. O par de iniciadores-controle amplifica uma região conservada do gene da  $\beta$ -globina humana, o qual está presente em todas as amostras de DNA humano e é usado para verificar a integridade da reação de PCR. Na presença de uma banda positiva de tipagem (amplificação de uma seqüência específica de um alelo da citocina), o produto dos iniciadores-controle pode ser mais fraco ou ausente devido à diferença na concentração e temperatura de hibridização entre o par de iniciadores específicos e o par de iniciadores do controle interno. Os fragmentos de DNA amplificados do par de iniciadores específicos da citocina foram menores do que o produto do par de iniciadores do controle interno. Desta forma a reação positiva para um alelo ou grupo de alelos de citocina específico foi visualizada no gel como um fragmento de DNA amplificado entre a banda produto do controle interno e a banda de iniciadores não incorporados.

Após a eletroforese, os produtos amplificados foram visualizados usando luz ultravioleta e fotografados com auxílio de um transluminador. Os resultados foram interpretados usando mapas das placas de genotipagem de citocinas fornecidas pelo fabricante do kit de PCR.

## 5.7. PRODUÇÃO DE CITOCINAS IN VITRO

### 5.7.1. CULTURA DE SANGUE TOTAL

Foi distribuído 1,0 mL de sangue heparinizado em cada um de três poços em placas de cultura. Utilizou-se estimulação mitogênica com lipopolissacarídeo (LPS; *Escherichia coli* O26:B6; Sigma) na concentração de 10µg/mL e mitógeno Pokweed (*Phytolacca americana*) (PWM; Sigma) na concentração de 5µg/mL e as placas foram incubadas em estufa com ambiente atmosférico de 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37° C por 48 horas.

Ao final do período de incubação, as amostras de sangue foram centrifugadas e o sobrenadante foi aliqotado e armazenado a -20° C para posterior realização de ELISA para detecção da produção de citocinas.

### 5.7.2. DOSAGEM DE IL-6, IL-17 E TGF-β

As citocinas foram determinadas utilizando o kit DuoSet Human da R&D Systems, Inc. Foram utilizadas o soro e o sobrenadante do sangue estimulado com LPS, PWM e sem estímulo, seguindo as instruções do fabricante.

## 5.8. CÁLCULO AMOSTRAL:

O número de pacientes necessários para inclusão na coorte foi estimado com ajuda do “software” SAMPLES (PEPI versão 3.01- Computer Program for Epidemiologists- 1999—Brixton Books, Wales), Verificamos as freqüências alélicas mínimas encontradas para as mutações pontuais de maior relevância clínica no controle histórico (polimorfismos associados a hiperexpressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, IL10, TNF-α, TGF-

$\beta$ , IFN- $\gamma$  e polimorfismos de baixa expressão para IL-10). Calculamos em seguida os números amostrais capazes de demonstrar uma variação de 10% em relação a essas freqüências já demonstradas com 95% de intervalo de confiança. Obtivemos os seguintes valores:

TGF- $\beta$ : Considerando a menor freqüência com atributo clínico encontrada no controle histórico de 22% para o haplótipo alto produtor, combinando os alelos individuais das mutações no códon 10, o número amostral foi estimado em 66 indivíduos com PA incluídos

IL-10: Considerando a menor freqüência com atributo clínico encontrada no controle histórico de 36% para as mutações pontuais (-819) T e (-592) A, o número amostral foi estimado em 84 indivíduos com PA incluídos.

IL-6: Considerando a menor freqüência com atributo clínico encontrada no controle histórico de 79% para a mutação pontual G na posição 174, o número amostral foi estimado em 64 indivíduos com PA incluídos.

Para o TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , a aplicação da variação de 10% poderia implicar em um número ínfimo de casos. Utilizamos uma variação máxima de 5%, obtendo os seguintes números:

TNF- $\alpha$ : Considerando a menor freqüência com atributo clínico encontrada no controle histórico de 11% para a mutação pontual A na posição 308, o número amostral foi estimado em 151 indivíduos com PA incluídos.

IFN- $\gamma$  Considerando a menor freqüência com atributo clínico encontrada no grupo controle de 9% para a mutação pontual T no íntron 1, o número amostral foi estimado em 126 indivíduos com PA incluídos

Verifica-se, portanto, uma ampla faixa de variação entre os cálculos amostrais específicos, embora a maioria dos polimorfismos exija números amostrais menores que 100 indivíduos. A metodologia empregada pode abreviar a necessidade de manter esse número, passando para um menor.

Uma vez que os kits de teste permitem a realização simultânea de cerca de 24 testes, julgamos que 150 testes serão suficientes para as demonstrações pretendidas. Caso necessário, estas amostras poderão ser ampliadas ou reduzidas. Caso o tempo de realização do protocolo será também um determinante

Verifica-se, portanto, uma variação entre os valores amostrais específicos, embora a maioria dos polimorfismos exija números amostrais menores que 100 indivíduos. De acordo com esses dados 150 indivíduos seriam suficientes para as demonstrações pretendidas. Tendo obtido resultados expressivos, de acordo com dados da literatura, e como o custo e o tempo de realização do protocolo são também determinantes, foi necessário finalizar este trabalho, para posteriormente ser ampliado.

## 5.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A freqüência genotípica foi obtida com a contagem direta dos alelos identificados no PCR. A freqüência alélica foi calculada pela divisão do número de alelos encontrados pelo número total de genes analisados por loco.

Para os fenótipos previstos de produção de cada citocina foram utilizados os padrões do fabricante do kit de genotipagem que seguem os descritos na literatura (TURNER et al., 1997; WILSON et al., 1997; PRAVICA et al., 2000; HOFFMAN et al., 2001).

A comparação entre as freqüências alélicas e genotípicas, entre os diferentes grupos, foi feita com o teste exato de Fisher, sendo estabelecido o nível de significância  $p < 0,05$ . O programa "GraphPad In stat 3.Inl." foi utilizado nas análises.

Para as dosagens de citocinas, devido à não aderência dos dados à distribuição normal teórica, optou-se pelo emprego de estatísticas baseadas em postos. Desse modo, foram calculados os quartis, o intervalo inter-quartil e o coeficiente de variação para a mediana. Foi utilizado o programa R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, 2.7.2, URL <http://www.R-project.org>.

## 6. RESULTADOS

O grupo de estudo foi composto por 32 indivíduos com PA, 63 indivíduos com PC, 64 indivíduos compondo o grupo Controle pareado quanto à idade, gênero e etnia com os pacientes com PA e 210 doadores de sangue (Tabela 1).

Os pacientes com PA foram selecionados em quatro hospitais: dez no Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos (C-HUPES/UFBA); dez no Hospital São Rafael (HSR); um no Hospital Geral Roberto Santos (HGRS) e 11 no Hospital Aliança (HA).

Os pacientes com PC foram selecionados no Ambulatório de Gastroenterologia e Hepatologia do HUPES. Entre esses pacientes 29 tinham participado do estudo inicial (BENDICHO *et al.*, 2005) e foram selecionados mais 34, totalizando 63 pacientes.

O grupo controle foi constituído por 210 doadores voluntários de sangue de um Serviço de Hemoterapia de Salvador. Destes, 94 constituíram o grupo controle para o grupo de PC no estudo inicial e foram incluídos 116.

Para o grupo controle pareado para o grupo de estudo de PA, foram selecionados 48 doadores voluntários no Serviço de Transfusão de Sangue – STS, e 16 participantes de um grupo da “Terceira Idade” atendidos na Universidade Estadual da Bahia (UNEB). Entre esses doadores, 29 foram do gênero feminino e 19 do gênero masculino, e os participantes do grupo da “Terceira Idade”, foram três do gênero masculino e 13 do gênero feminino. Este grupo totalizou 64 participantes.

Os pacientes com PA tiveram idade mais elevada que os pacientes com PC e que o grupo de doadores de sangue. A média de idade foi  $54,2 \pm 13,1$  anos para o gênero masculino e  $48,9 \pm 16,3$  anos para o gênero feminino no grupo com PA e  $45,5 \pm 9$  anos para o gênero masculino e  $42 \pm 23,8$  anos para o gênero feminino no grupo com PC. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de pacientes com PC e o grupo controle (Tabela 1).

O número de mulheres foi maior no grupo de pacientes com PA (21 mulheres e 11 homens) que no grupo de pacientes com PC (seis mulheres e 57 homens).

TABELA 1 - DADOS DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES E CONTROLES PARTICIPANTES DO ESTUDO.

		Pancreatite crônica		Pancreatite Aguda		Controle pareado_ PA		Doadores de sangue		
		PC		PA		C_PA		DS		
		n=63		n=32		n=64		n=210		
		M	F	M	F	M	F	M	F	
Gênero	n	57	6	11	21	22	42	159	1	5
Idade (X±s)	(máx –min)	45,5 ± 9	42 ± 23,8	54,2 ± 13,1	48,9 ± 16,3	51,5 ± 11,8	48,8± 15,9	38,7± 10,2	38,6± 11,1	
	(anos)	19 - 65	24 - 79	32 - 74	21 -75	32 - 75	20 - 79	18 - 58	19 - 57	
Etnia	B	4	0	1	6	2	12	8		8
	MC	15	3	7	7	14	14	52	1	2
	MM	11	1	3	6	6	12	58	0	2
	ME	12	0	0	2	0	4	41		2
	ND	15	2	-	-	-	-	-		-

B – branco; MC – mestiço claro; MM – mestiço médio; ME - mestiço escuro; ND – não determinado (Krieger *et al.*, 1965 mod)



Na PA foi caracterizada etiologia biliar em 21 pacientes, hipertrigliceridemia em um paciente e em dez pacientes não foi possível determinar o fator etiológico. Entre os pacientes com PC, em 46 o fator etiológico foi alcoolismo, em um paciente foi obstrução, em dois pacientes foi nutricional e 14, indeterminado.

## 6.1. POLIMORFISMOS DE CITOCINAS

### 6.1.1 POLIMORFISMOS (CÓDON 10T/C; CÓDON 25G/C) DO GENE DE TGF- $\beta$ 1.

#### 6.1.1.1. CÓDON 10 (T/C)

A distribuição das freqüências alélicas, genóticas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo no códon 10 T/C do gene TGF- $\beta$ 1 observada nos grupos de pacientes com PC, PA, controle pareado e doadores de sangue é mostrada na tabela 2 e figuras 1 e 2. A freqüência alélica observada nos quatro grupos foi semelhante sendo para o alelo T entre 0,5190 e 0,5781 e para o alelo C entre 0,4219 e 0,4810. A análise destes dados com o teste exato de Fisher não revelou diferença significativa entre as freqüências observadas nos quatro grupos ( $p > 0,05$ ).

As freqüências observadas para os genótipos TT, TC e CC variou entre 0,2667 a 0,3438; 0,4375 a 0,5079 e 0,1746 a 0,2285 respectivamente nos grupos estudados. A comparação das freqüências dos genótipos entre os grupos não revelou diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$  teste exato de Fisher).

Adicionalmente foi verificada se o grupo de pacientes com PA e o grupo controle pareado diferiam quanto a esses genótipos, do grupo de doadores de sangue, mas não houve diferença estatisticamente significativa.

TABELA 2 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMO DO GENE DE TGF- $\beta$ 1 (CÓDON 10T/C).

Alelo / Genótipo	Doadores de sangue (DS) n=210	Pancreatite crônica (PC) n=63	Pancreatite aguda (PA) n=32	Controle pareado_ PA (C_PA) n=64	<i>p</i>		
					PA X PC	PA X C_PA	PC X DS
T	(218) 0,5190	(72) 0,5714	(36) 0,5625	(74) 0,5781	1,0000	0,8777	0,3107
C	(202) 0,4810	(54) 0,4286	(28) 0,4375	(54) 0,4219			
TT	(56) 0,2667	(11) 0,3438	(11) 0,3438	(22) 0,3438	0,8200 <sup>a</sup>	1,0000 <sup>a</sup>	0,4276 <sup>a</sup>
TC	(106) 0,5048	(14) 0,4375	(14) 0,4375	(30) 0,4687			
CC	(48) 0,2285	(07) 0,2187	(07) 0,2187	(12) 0,1875	0,5927 <sup>b</sup>	0,7880 <sup>b</sup>	0,4851 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> TT/TC+CC; <sup>b</sup> CC/TT+TC.

### 6.1.1.2. CÓDON 25 (G/C)

A distribuição das freqüências alélicas, genotípicas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo do gene TGF- $\beta$ 1 no códon 25 (G/C) observada nos quatro grupos é mostrada na tabela 3 e figuras 3 e 4. As freqüências observadas para os alelos G e C foram 0,90219; 0,9364; 0,8984 e 0,8595 no grupo de pacientes com PA, pacientes com PC, Controle pareado e doadores de sangue, respectivamente para o alelo G e 0,0781; 0,0796; 0,1016 e 0,1405 nesses mesmos grupos, para o alelo C. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na freqüência dos alelos observados entre os grupos ( $p > 0,05$  teste exato de Fisher), porém a comparação entre o grupo de PC e os doadores de sangue mostrou uma provável tendência a com maior freqüência do alelo G nos pacientes com PC ( $p = 0,0682$ ).

As freqüências observadas para os genótipos GG, GC e CC, variou entre 0,7524 a 0,8730; 0,1270 a 0,2333 e 0 a 0,0312 respectivamente no grupo de pacientes com PA, pacientes com PC, Controle pareado e doadores de sangue. A comparação das freqüências dos genótipos entre os grupos não mostrou diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$  teste exato de Fisher), porém a comparação entre o grupo de PC e os doadores de sangue mostrou uma provável tendência ( $p = 0,0552$ ) a maior freqüência do genótipo GG nos pacientes com PC, reforçando a observação da maior freqüência alélica do alelo G nesses pacientes.

Adicionalmente foi verificada se o grupo de pacientes com PA e o grupo controle pareado diferiam do grupo de doadores de sangue, mas não houve diferença estatisticamente significativa.

TABELA 3 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DO POLIMORFISMO DO GENE DE TGF-B (CÓDON 25G/C).

Alelo / Genótipo	Doadores de sangue (DS) n=210	Pancreatite crônica (PC) n=63	Pancreatite aguda (PA) n=32	Controle pareado_PA (C_PA) n=64	<i>p</i>		
					PA X PC	PA X C_PA	PC X DS
G	(361) 0,8595	(118) 0,9365	(59) 0,9219	(115) 0,8984	1,0000	0,7939	0,0682
C	(59) 0,1405	(08) 0,0635	(05) 0,0782	(13) 0,1016			
GG	(158) 0,7524	(55) 0,8730	(27) 0,8438	(53) 0,8281	0,7561 <sup>a</sup>	1,0000 <sup>a</sup>	0,0552 <sup>a</sup>
GC	(49) 0,2333	(08) 0,1270	(05) 0,1562	(09) 0,1407			
CC	(03) 0,0143	(0) 0,0000	(0) 0,0000	(02) 0,0312	-	0,5509 <sup>b</sup>	1,0000 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> GG/GC+CC; <sup>b</sup> CC/GG+GC.

### 6.1.1.3. DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS FENOTÍPICAS

A distribuição das frequências dos fenótipos previstos para o polimorfismo do gene TGF- $\beta$ 1 (códon 10T/C; códon 25G/C) observada nos grupos de pacientes com Pancreatite crônica e de indivíduos sadios é mostrada na tabela 4 e figura 5.

As frequências fenotípicas inferidas com base na análise dos genótipos foram 0,6563; 0,3125 e 0,0312 para o grupo de pacientes com PA; 0,7619; 0,1745 e 0,06357 no grupo de pacientes com PC; 0,6875; 0,2656; 0,0469 para o grupo controle pareado e 0,5953; 0,3333 e 0,0714 para o grupo de doadores de sangue, para alto, intermediário e baixo produtor de TGF- $\beta$ 1, respectivamente.

A frequência de indivíduos com fenótipo previsto de alto produtor desta citocina é significativamente maior no grupo de pacientes com PC em comparação ao grupo de doadores de sangue [ $p=0,0172$ ; OR=0,4596; intervalo de confiança (0,2418 a 0,8734), teste exato de Fisher].

As frequências dos fenótipos previstos dos pacientes com PA não mostram diferença estatisticamente significativa do grupo controle pareado. Adicionalmente foi verificada se a frequência no grupo de pacientes com PA e o grupo Controle pareado diferiam das observadas no grupo de doadores de sangue, mas não houve diferença estatisticamente significativa.

TABELA 4 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E FENOTIPOS PREVISTOS PARA O POLIMORFISMO DO GENE DE TGF-β1 (CÓDON 10T/C; CÓDON 25G/C).

Genótipo / Fenótipo	Doadores de sangue (DS) n=210	Pancreatite crônica (PC) n=63	Controle pareado_ PA (C_PA) n=64	Pancreatite aguda (PA) n=32
T/T G/G <sup>1</sup>	(53) 0,2524	(20) 0,3175	(10) 0,3125	(22) 0,3438
T/C G/G <sup>1</sup>	(72) 0,3429	(28) 0,4444	(11) 0,3438	(22) 0,3438
T/C G/C <sup>2</sup>	(34) 0,1619	(04) 0,0635	(03) 0,0937	(08) 0,1250
C/C G/G <sup>2</sup>	(33) 0,1571	(07) 0,1111	(06) 0,1876	(09) 0,1406
T/T G/C <sup>2</sup>	(03) 0,0143	(0) 0,0000	(01) 0,0312	(0) 0,0000
C/C G/C <sup>3</sup>	(12) 0,0571	(04) 0,0635	(01) 0,0312	(01) 0,0156
C/C C/C <sup>3</sup>	(03) 0,0143	(0) 0,0000	(0) 0,0000	(02) 0,0312
T/T C/C <sup>3</sup>	(0) 0,0000	(0) 0,0000	(0) 0,0000	(0) 0,0000
T/C C/C <sup>3</sup>	(0) 0,0000	(0) 0,0000	(0) 0,0000	(0) 0,0000
Alto produtor <sup>1</sup>	(125) 0,5953	(48) 0,7619	(21) 0,6563	(44) 0,6875
Intermediário <sup>2</sup>	(70) 0,3333	(11) 0,1746	(10) 0,3125	(17) 0,2656
Baixo produtor <sup>3</sup>	(15) 0,0714	(04) 0,0635	(01) 0,0312	(03) 0,0469

### 6.1.2. POLIMORFISMO -174G/C DO GENE DE IL-6

A distribuição das freqüências alélicas, genóticas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo -174G/C do gene IL-6 observada nos diferentes grupos estudados é mostrada na tabela 7 e figuras 6, 7 e 8. As freqüências observadas para os alelos G e C foram, respectivamente, 0,6719 e 0,3281 no grupo de pacientes com PA; 0,8571 e 0,1429 grupo de pacientes com PC; 0,8047 e 0,1953 no grupo controle pareado e 0,7667 e 0,2333 do grupo de doadores de sangue. A comparação das freqüências entre os grupos revelou diferença estatisticamente significativa entre o grupo de pacientes com PA e o grupo de pacientes com PC [ $p=0,0041$ ; OR=0,5289 Intervalo de confiança (0,3598 a 0,7774); teste exato de Fisher], e entre o grupo de pacientes com PA e o grupo controle pareado [ $p=0,0494$ ; OR=0,6451 Intervalo de confiança -0,4311 a 0,9655; teste exato de Fisher].

As freqüências genóticas observadas para os genótipos GG, GC e CC nos grupos foram 0,5312; 0,2812 e 0,1876 no grupo de pacientes com PA, de 0,7143; 0,2857 e 0 no grupo de pacientes com PC, de 0,6719; 0,2656 e 0,0625 no grupo controle pareado e 0,6000; 0,3333 e 0,0667 do grupo de doadores de sangue, respectivamente. As diferenças observadas entre os grupos são estatisticamente significantes quando comparados o grupo de pacientes com PA e o grupo de pacientes com PC [ $p=0,0010$ ; OR=3,423 Intervalo de confiança (2,477 a 4,730), teste exato de Fisher], e quando comparado o grupo de pacientes com PC e os doadores de sangue PC [ $p=0,0450$ ; OR=1,321 Intervalo de confiança (1,233 a 1,416), teste exato de Fisher].

As freqüências dos fenótipos previstos para altos e baixos produtores de IL-6 foram 0,8125 e 1,875 no grupo de pacientes com PA; 1 e 0 grupo de pacientes com PC; 0,9375 e 0,0625 no grupo controle pareado e 0,9333 e 0,0667 no grupo de doadores de sangue, respectivamente. As diferenças observadas entre o grupo de pacientes com PA e o grupo de pacientes com PC são estatisticamente significantes [ $p=0,0010$ ; OR=3,423 Intervalo de confiança (2,477 a 4,730), teste exato de Fisher], e entre o grupo de pacientes com PC e os doadores de sangue PC [ $p=0,0450$ ; OR=1,321 Intervalo de confiança (1,233 a 1,416), teste exato de Fisher].



TABELA 5 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E FENOTIPOS PREVISTOS PARA O POLIMORFISMO -174 G/C DO GENE DE IL-6.

Alelo / Genótipo / Fenótipo previsto	Doadores de sangue (DS) n=210	Pancreatite crônica (PC) n=63	Controle pareado_ PA (C_PA) n=64	Pancreatite aguda (PA) n=32	<i>p</i>		
					PA X PC	PA X C_PA	PC X DS
G	(322) 0,7667	(108) 0,8571	(43) 0,6719	(103) 0,8047	0,0041	0,0494	0,7743
C	(98) 0,2333	(18) 0,1429	(21) 0,3281	(25) 0,1953			
GG <sup>1</sup>	(126) 0,6000	(45) 0,7143	(17) 0,5312	(43) 0,6719	0,1100 <sup>a</sup>	0,1893 <sup>a</sup>	0,1052 <sup>a</sup>
GC <sup>1</sup>	(70) 0,333	(18) 0,2857	(09) 0,2812	(17) 0,2656			
CC <sup>2</sup>	(14) 0,0667	(00) 0,0000	(06) 0,1876	(04) 0,0625	0,0010 <sup>b</sup>	0,0789 <sup>b</sup>	0,0450 <sup>b</sup>
Alto produtor <sup>1</sup>	(196) 0,9333	(63) 1,0000	(26) 0,8125	(60) 0,9375	0,0010	0,0789	0,0450
Baixo Produtor <sup>2</sup>	(13) 0,0619	(00) 0,0000	(06) 0,1875	(04) 0,0625			

<sup>a</sup> GG/GC+CC ; <sup>b</sup> CC/GG+ CG.

### 6.1.3. POLIMORFISMO NO GENE TNF- $\alpha$ NA POSIÇÃO -308

A distribuição das freqüências alélicas, genóticas e fenotípica para o polimorfismo no gene de TNF- $\alpha$  -308G/A, nos grupos estudados, são mostradas na tabela 8 e figuras 9, 10 e 11. As freqüências observadas para os alelos G e A foram, respectivamente, de 0,8906 e 0,1094 no grupo de pacientes com PA, de 0,8492 e 0,1508 no grupo de pacientes com PC, de 0,8125 e 0,1875 no grupo controle pareado e 0,8595 e 0,1405 do grupo de doadores de sangue. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p>0,05$ ).

As freqüências observadas dos genótipos GG, GA e AA foram, respectivamente, 0,8126; 0,1563 e 0,0312 grupo de pacientes com PA, de 0,7619; 0,1746 e 0,0634 no grupo de pacientes com PC, de 0,6875; 0,2500 e 0,0625 no grupo controle pareado e 0,7476; 0,2238 e 0,0286 do grupo de doadores de sangue. A análise estatística mostra que as diferenças observadas entre os grupos não são significantes ( $p>0,05$ ).

Para os fenótipos previstos de alto e baixo produtores as freqüências são 0,8125 e 0,1875 no grupo de pacientes com PA, de 0,7460 e 0,2381 no grupo de pacientes com PC, de 0,6875 e 0,3125 no grupo controle pareado e 0,7476 e 0,2524 do grupo de doadores de sangue. A comparação das freqüências entre os grupos não revelou diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ).

TABELA 6 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E FENOTIPOS PREVISTOS PARA O POLIMORFISMO -308 G/A DO GENE DE TNF- $\alpha$ .

Alelo / Genótipo / Fenótipo previsto	Doadores de sangue (DS) n=210	Pancreatite crônica (PC) n=63	Pancreatite aguda (PA) n=32	Controle pareado_PA (C_PA) n=64	<i>p</i>		
					PA X PC	PA X C_PA	PC X DS
G	(361) 0,8595	(107) 0,8492	(57) 0,8906	(104) 0,8125	0,5082	0,2130	0,7725
A	(59) 0,1405	(19) 0,1508	(07) 0,1094	(24) 0,1875			
GG <sup>2</sup>	(157) 0,7476	(48) 0,7619	(26) 0,8125	(44) 0,6875	0,7941 <sup>a</sup>	0,2302 <sup>a</sup>	0,8696 <sup>a</sup>
GA <sup>1</sup>	(47) 0,2238	(11) 0,1746	(05) 0,1563	(16) 0,2500			
AA <sup>1</sup>	(06) 0,0286	(04) 0,0634	(01) 0,0312	(04) 0,0625	0,6601 <sup>b</sup>	0,6619 <sup>b</sup>	0,2463 <sup>b</sup>
Alto produtor <sup>1</sup>	(157) 0,7476	(48) 0,7619	(26) 0,8125	(44) 0,6875	0,6109	0,2302	0,8696
Baixo Produtor <sup>2</sup>	(53) 0,2524	(15) 0,2381	(06) 0,1875	(20) 0,3125			

<sup>a</sup> GG/GA+AA; <sup>b</sup> AA/TT+TA.

#### 6.1.4. POLIMORFISMO +874T/A DO GENE DO IFN- $\gamma$

A distribuição das frequências alélicas, genóticas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo +874 (T/A) do gene IFN- $\gamma$  observada nos grupos estudados é mostrada na tabela 9 e figuras 12, 13 e 14. As frequências observadas para os alelos T e A foram, respectivamente, 0,4375 e 0,5625 no grupo de pacientes com PA; 0,3571 e 0,6429 grupo de pacientes com PC; 0,3906 e 0,6094 no grupo controle pareado e 0,3476 e 0,6524 do grupo de doadores de sangue. A análise pelo teste exato de Fisher mostrou que as diferenças observadas entre os grupos não são estatisticamente significantes ( $p > 0,05$ ).

As frequências observadas dos genótipos TT, TA e AA foram, respectivamente, 0,2500, 0,3750 e 0,3750 no grupo de pacientes com PA; 0,1587; 0,3969 e 0,4444 grupo de pacientes com PC; 0,2187; 0,3438 e 0,4375 no grupo controle pareado e 0,1428; 0,4095 e 0,4476 do grupo de doadores de sangue. A análise estatística mostra que as diferenças observadas entre os grupos não são estatisticamente significantes ( $p > 0,05$ ).

Para os fenótipos previstos de altos, intermediários e baixos produtores de IFN- $\gamma$ , as frequências foram 0,2500, 0,3750 e 0,3750 no grupo de pacientes com PA; 0,1587; 0,3969 e 0,4444 grupo de pacientes com PC; 0,2187; 0,3438 e 0,4375 no grupo controle pareado e 0,1428; 0,4095 e 0,4476 do grupo de doadores de sangue, respectivamente. As diferenças observadas entre os grupos não são estatisticamente significantes ( $p > 0,05$ ).

TABELA 7 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E FENOTIPOS PREVISTOS PARA O POLIMORFISMO +874 T/A DO GENE DE IFN- $\gamma$  .

Alelo / Genótipo / Fenótipo previsto	Doadores de sangue (DS) n=210	Pancreatite crônica (PC) n=63	Pancreatite aguda (PA) n=32	Controle pareado_ PA (C_PA) n=64	PA X PC
T	(146) 0,3476	(45) 0,3571	(28) 0,4375	(50) 0,3906	0,3439
A	(274) 0, 6524	(81) 0,6429	(36) 0,5625	(78) 0,6094	
TT	(30) 0,1428	(10) 0,1587	(08) 0,2500	(14) 0,2187	0,2852 <sup>a</sup>
TA	(86) 0,4095	(25) 0,3969	(12) 0,3750	(22) 0,3438	
AA	(94) 0,4476	(28) 0,4444	(12) 0,3750	(28) 0,4375	0,6606 <sup>b</sup>
Alto produtor	(30) 0,1428	(10) 0,1587	(08) 0,2500	(14) 0,2187	0,2852 <sup>a</sup>
Intermediário	(86) 0,4095	(25) 0,3969	(12) 0,3750	(22) 0,3438	
Baixo Produtor	(94) 0,4476	(28) 0,4444	(12) 0,3750	(28) 0,4375	0,6606 <sup>b</sup>

#### 6.1.5. POLIMORFISMOS (-1082G/A; -819C/T; -592C/A) DO GENE DE IL-10

As possíveis combinações dos polimorfismos nas posições -1082, -819 e -592 formam os haplótipos GCC, ACC e ATA. Esses haplótipos podem compor os genótipos GCC/GCC, GCC/ACC, GCC/ATA, ACC/ACC, ACC/ATA e ATA/ATA. Para a análise estatística, os genótipos foram agrupados de acordo com os fenótipos previstos. Assim, foram agrupados os valores obtidos com os genótipos GCC/ACC e GCC/ATA (produtores intermediários), os valores obtidos com os genótipos ACC/ACC, ACC/ATA e ATA/ATA (baixos produtores) e o genótipo GCC/GCC, que corresponde a altos produtores. A análise mostrou não haver diferenças significantes entre os fenótipos previstos de alto, intermediário e baixo produtor nos grupos comparados ( $p > 0,05$ ). Os dados estão representados na tabela 10.

#### 6.1.6 EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG

As frequências alélicas, genotípicas e dos fenótipos previstos dos grupos estudados, seguem o equilíbrio de Hardy-Weinberg (dados não mostrados).

TABELA 8 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E FENOTIPOS PREVISTOS PARA OS POLIMORFISMOS -1082G/A, -819C/T E -592C/A DO GENE DE IL-10.

Alelo / Genótipo / Fenótipo previsto	Doadores de sangue (DS) n=210	Pancreatite crônica (PC) n=63	Pancreatite aguda (PA) n=32	Controle pareado_ PA C_PA n=64	<i>p</i>		
					PA X PC	PA X C_PA	PC X DS
-1082G	(171) 0,4071	(44) 0,3492	(18) 0,2812	(50) 0,3906	0,4138	0,1519	0,2546
-1082A	(249) 0,5929	(82) 0,6508	(46) 0,7188	(78) 0,6094			
-819 C	(270) 0,6429	(82) 0,6508	(43) 0,6719	(85) 0,6641	0,8717	1,0000	0,9157
-819 T	(150) 0,3571	(44) 0,3492	(21) 0,3281	(43) 0,3359			
-592 C	(270) 0,6429	(82) 0,6508	(43) 0,6719	(85) 0,6641	0,8717	1,0000	0,9157
-592 A	(150) 0,3571	(44) 0,3492	(21) 0,3281	(43) 0,3359			
GCC/GCC	(27) 0,1286	(08) 0,1270	(02) 0,0625	(11) 0,1719			
GCC/ACC	(44) 0,2095	(10) 0,1587	(06) 0,1875	(16) 0,2500			
GCC/ATA	(56) 0,2667	(18) 0,2857	(08) 0,2500	(12) 0,1875			
ACC/ACC	(13) 0,0619	(07) 0,1111	(06) 0,1875	(04) 0,0625			
ACC/ATA	(46) 0,2190	(14) 0,2222	(07) 0,2188	(11) 0,1719			
ATA/ATA	(24) 0,1143	(06) 0,0953	(03) 0,0937	(10) 0,1562			
Alto produtor	(27) 0,1286	(08) 0,1270	(02) 0,0625	(11) 0,1719	0,4866 <sup>a</sup>	0,2082 <sup>a</sup>	1,0000 <sup>a</sup>
Intermediário	(100) 0,4762	(28) 0,4444	(14) 0,4375	(28) 0,4375			
Baixo Produtor	(83) 0,3952	(27) 0,4286	(16) 0,5000	(25) 0,3906	0,5221 <sup>b</sup>	0,5103 <sup>b</sup>	0,6622 <sup>b</sup>

## 6.2 PRODUÇÃO DE CITOCINAS *IN VITRO*

Em decorrência dos achados referentes às genotipagens das citocinas, foi planejado a realização de um estudo piloto de produção de citocinas “in vitro”. O objetivo foi obter informações para a adequação necessária a realização do projeto que dará continuidade a esta linha de pesquisa em pancreatites.

### 6.2.1- FATOR DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO- $\beta$ 1 - (TGF- $\beta$ 1)

A dosagem de TGF- $\beta$ 1 foi realizada em sobrenadante de cultura de células de amostras de sangue de quatro pacientes com PA e cinco pacientes com PC. Foram realizadas três culturas dessas amostras, incubada sem estímulo (puro), estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) e estimuladas com Pokeweed (PWN). Os resultados das dosagens do TGF- $\beta$ 1 nessas amostras e o fenótipo previsto obtido pela genotipagem desses pacientes estão na tabela 11.

TABELA 9 – DOSAGEM DE TGF- $\beta$ 1 EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE SANGUE SEM ESTÍMULO (PURO), COM LIPOPOLISACARÍDEO (LPS) E COM POKEWEED (PWN) EM PACIENTES COM PA E EM PACIENTES COM PC; FENÓTIPO PREVISTOS DE PRODUÇÃO DE TGF- $\beta$ 1 .

Fenótipo previsto		Puro (pg/mL)	LPS (pg/mL)	PWN (pg/mL)
PA1	Alto	14901	7381	14737
PA2	Alto	14192	13009	21919
PA3	Alto	5137	7831	10737
PA4	Alto	10364	8348	12946
PC1	Intermediário	6719	8353	20019
PC2	Intermediário	6892	11759	18092
PC3	Intermediário	2183	3498	16292
PC4	Intermediário	5701	13698	16437
PC5	Alto	14419	9259	13528

As dosagens de cada paciente nas três diferentes culturas nos grupos de pacientes com PA e de pacientes com PC estão mostradas na figura 16 e a estatística descritiva desses dados na tabela 12.



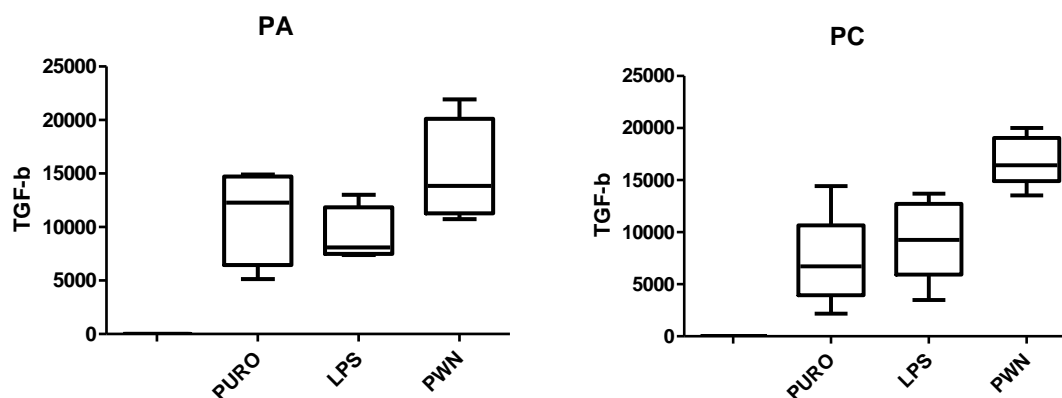


FIGURA 4 – DOSAGEM DE TGF- $\beta$ 1 EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE SANGUE SEM ESTÍMULO (PURO), COM LIPOPOLISACARIDEO (LPS) E COM POKEWEEED (PWM) EM PACIENTES COM PA (N=4) E EM PACIENTES COM PC (N=5).

As dosagens de TGF- $\beta$ 1 no sobrenadante da cultura de sangue sem estímulo e com LPS variam em um intervalo maior no grupo de PC (2183 a 14419 Puro; 3498 a 13698 em LPS), diferentemente do que ocorreu nas dosagens da cultura com PWM (13528 a 20019). A mediana foi 6.719 ( $\pm 17,73$ ), 9259 ( $\pm 36,79$ ) e 16437 ( $\pm 10,95$ ) no grupo de pacientes com PC e 12.278 ( $\pm 43,26$ ), 8090 ( $\pm 22,19$ ) e 13842 ( $\pm 29,9$ ) no grupo de pacientes com PA nas culturas sem estímulo, com LPS e com PWM respectivamente. Nos dois grupos de pacientes as dosagens de TGF- $\beta$ 1 foram mais elevadas no sobrenadante da cultura com PWM, com mediana mais elevada nos pacientes com PC. Estes pacientes tiveram a mediana bastante aumentada em relação a cultura sem estímulo, e os pacientes com PA mantiveram a mediana próxima a obtida na cultura sem estímulo.

TABELA 10 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA DOSAGEM DE TGF- $\beta$ 1 EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE SANGUE SEM ESTÍMULO (PURO), COM LIPOPOLISACARIDEO (LPS) E COM POKEWEED (PWM) EM PACIENTES COM PA(N=4) E EM PACIENTES COM PC (N=5).

		Min	Max	p25	p75	md	cvmd	iiq
Puro	PA	5137	14901	9057	14369	12278	43,26	5312
	PC	2183	14419	5701	6892	6719	17,73	1191
LPS	PA	7381	13009	7718	9513	8090	22,19	1795
	PC	3498	13698	8353	11759	9259	36,79	3406
PWM	PA	10737	21919	12394	16533	13842	29,9	4139
	PC	13528	20019	16292	18092	16437	10,95	1800

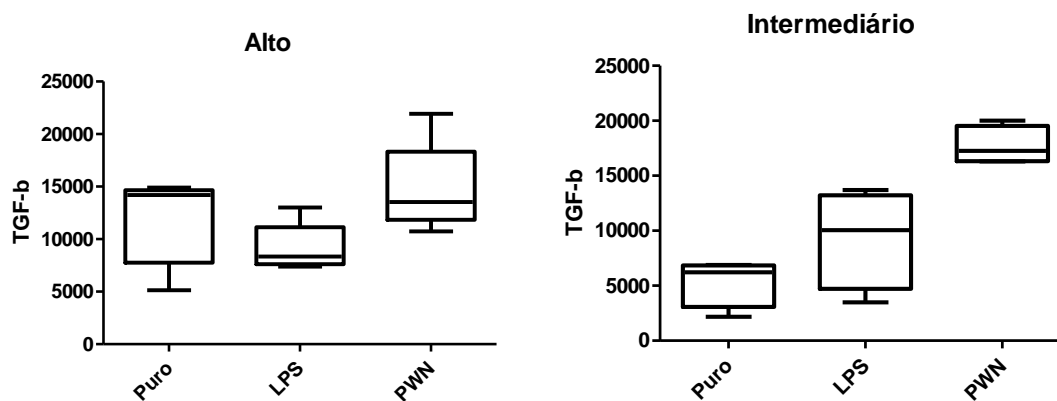


FIGURA 5 – DOSAGEM DE TGF- $\beta$ 1 EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE SANGUE SEM ESTÍMULO (PURO), COM LIPOPOLISACARIDEO (LPS) E COM POKEWEED (PWM) EM INDIVÍDUOS COM FENÓTIPO PREVISTO DE INTERMEDIÁRIO (N=4) E ALTO PRODUTORES (N=5) DE TGF- $\beta$ 1.

As dosagens dos pacientes com pancreatite quando agrupados de acordo com o fenótipo previsto de intermediário ou alto produtor de TGF- $\beta$ 1 mostram um comportamento diferenciado. Os pacientes com fenótipo previsto de alto produtor tiveram mediana crescente quanto à cultura sem estímulo, com LPS e com PWM, além de terem as dosagens bastante homogêneas na cultura sem estímulo e com PWM, variando apenas nas dosagens das culturas com LPS. Diferentemente, no grupo de pacientes com fenótipo previsto de produtor intermediário, a mediana nas dosagens na cultura sem estímulo e com PWM foram semelhantes, e com LPS foi inferior.

TABELA 11 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA DOSAGEM DE TGF- $\beta$ 1 EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE SANGUE SEM ESTÍMULO (PURO), COM LIPOPOLISACARIDEO (LPS) E COM POKEWEEED (PWM) EM PACIENTES COM FENÓTIPO PREVISTO DE INTERMEDIÁRIO (N=4) E ALTO PRODUTORES (N=5) DE TGF- $\beta$ 1.

		Min	Max	p25	p75	md	cvmd	iiq
Puro	Interm	5137	14901	10364	14419	14192	28,57	4055
	Alto	2183	6892	4822	6762	6210	31,25	1941
LPS	Interm	7381	13009	7831	9259	8348	17,11	1428
	Alto	3498	13698	7139	12244	10056	50,76	5104
PWM	Interm	10737	21919	12946	14737	13528	13,24	1791
	Alto	16292	20019	16401	18574	17265	12,59	2173

### 6.2.2 INTERLEUCINA -6 (IL-6)

As dosagens de IL-6 foram realizadas em sobrenadante de cultura de células num total de quatro pacientes com PA e cinco pacientes com PC. Os valores obtidos na primeira dosagem foram muito elevados, sendo necessário repetir as dosagens com diluições maiores. Nas amostras de cultura com estímulo, o valor variou de 15.000 pg/mL a 280.000 pg/mL, e sem estímulo 0 a 2.000 pg/mL. A reprodução dessas dosagens foi comprometida pela quantidade da amostra do sobrenadante das culturas insuficiente e assim será necessário a coleta de novas amostras.

A dosagens de citocinas realizadas tinha um caráter de estudo piloto para analisar as possíveis dificuldades e adequar para a realização de um projeto que tenha esse objetivo. Assim, a realização de novos testes com esta citocina serão parte do novo projeto de pesquisa.

### 6.2.3 INTERLEUCINA -17 (IL-17)

As dosagens de IL-17 foi realizada em sobrenadante de cultura de células num total de quatro pacientes com PA e cinco pacientes com PC. Os valores obtidos nas dosagens são mostrados na tabela 13.

TABELA 12 – DOSAGEM DE IL-17 EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE SANGUE SEM ESTÍMULO (PURO), COM LIPOPOLISACARIDEO (LPS) E COM POKEWEEED (PWM) EM PACIENTES COM PA E PC.

	Puro pg/mL	LPS pg/mL	PWN pg/mL
PA1	0	0	18
PA2	0	0	24
PA3	0	0	87
PA4	0	0	692
PC1	0	0	382
PC2	0	0	54
PC3	0	0	77
PC4	0	0	0
PC5	0	236	0

A dosagem de IL-17 no sobrenadante de cultura de células sem estímulo nos pacientes com PA e PC foi zero e nas amostras estimuladas com LPS apenas um paciente apresentou valor diferente de zero. Nas dosagens das amostras estimuladas com PWM sete das nove amostras tiveram resultado que variou de 18 a 692 pg/mL. A dosagem da amostra PC5 foi zero quando sem estímulo e estimulada com PWM, mas com estímulo de LPS foi 236 pg/mL. Essa foi a única amostra dosada da cultura estimulada com LPS que diferiu de zero. Devido a essas duas considerações, necessita ser repetida para confirmar e então analisar o motivo dessa diferença, caso mantenha o resultado. Como não há amostra suficiente para a repetição dessa dosagem, não é possível considerar o achado.

## 7. DISCUSSÃO:

Neste estudo, os pacientes para o grupo PA foram selecionados tendo como critério de exclusão o diagnóstico anterior de PC e/ou etiologia alcoólica, a fim de constituir um grupo homogêneo. Um ponto crítico na realização de estudos abordando pancreatite é a seleção e classificação dos pacientes, devido à divergência entre especialistas quanto à opinião sobre as pancreatites agudas e crônicas serem patologias distintas. Isso pode ser observado quando, pacientes com diagnóstico de PC agudizam e são classificados diferentemente no grupo de PA ou PC de acordo com a equipe da pesquisa. Igualmente ocorre quando numa PA o fator etiológico envolvido é o álcool, já que alguns especialistas consideram que o alcoolista poderá vir a desenvolver PC posteriormente, e por isso, não deve ser incluído no grupo de PA (TESTONI *et al.*, 2001; SCHNEIDER *et al.*, 2004; FARKAS *et al.*, 2007).

O objetivo principal deste trabalho foi identificar marcadores genéticos de susceptibilidade ou de resistência para desenvolver pancreatite. Para isto foram comparados as frequências alélicas, genótípicas e dos fenótipos previstos de polimorfismos nos genes das citocinas em uma amostra de indivíduos com PC, com PA, doadores de sangue e participantes de um grupo da “Terceira Idade” na população de Salvador - Bahia.

### 7.1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO CONTROLE

O grupo de controles foi constituído de 210 doadores de sangue, tendo sido recrutados 94 na primeira fase do trabalho, paralelamente à seleção dos 29 pacientes com PC que resultou no primeiro artigo, e 116 na segunda fase da coleta de pacientes com PC e com PA.

Este grupo de doadores de sangue foi comparado a outros grupos populacionais descritas no site “Allele Frequencies in Worldwide Populations”

(<http://www.nanea.dk/cytokinesnps/>, 24/09/2008), quanto a frequência genotípica no códon 10 e no códon 25 (Tabela 5 e 6).

TABELA 13 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS DO GENE DE TGF-B1 (CÓDON 10T/C ) EM DOADORES DE SANGUE DE SALVADOR-BA (GRUPO CONTROLE) E EM DIFERENTES GRUPOS POPULACIONAIS.

Amostra populacional	Genótipo			p
	TT	TC	CC	
Brasil (Salvador) _ Doadores de Sangue	27	50	23	
Brasil (Salvador) _Controle pareado para PA	35	47	19	0,2853
Brasil (São Paulo)	17,4	45,9	36,7	0,0577
Portugal	25	47	28	0,7190
Argentina (Buenos Aires)	17,4	45,9	36,7	0,0577
Venezuela	23,9	41,3	34,8	0,1695
Italia (Central)	21,4	50	28,6	0,4862
Italia (Torino)	22,9	45	32,1	0,3577
Inglaterra	14	44	42	0,0065*
Alemanha	13	52,5	34,5	0,0245*
Grécia	22	50	28	0,6064
USA Americanos Africanos	17,5	48,2	34,1	0,1378
Bulgária	30,4	44,8	24,8	0,7771
Israel	22,9	52,1	25	0,8015
Taiwan (Ami)	10	52	38	0,0031*
Taiwan (Atayal)	32	54	14	0,2507
Taiwan (Hakka)	31	53	16	0,4449
Taiwan (Minnan)	38	40	22	0,2237
Taiwan (Tsou,)	12	48	40	<0,0001*
Taiwan (Yami)	12	48	40	<0,0001*

<http://www.nanea.dk/cytokinesnps/>, 24/09/2008

TABELA 14 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS DO GENE DE TGF- $\beta$ 1 (CÓDON 25G/C ) EM DOADORES DE SANGUE DE SALVADOR-BA (GRUPO CONTROLE) E EM DIFERENTES GRUPOS POPULACIONAIS.

Amostra populacional	Frequência genotípica			
	CC	CG	GG	p
Brasil (Salvador) _ Doadores de Sangue	1	24	75	
Brasil (Salvador) _Controle pareado para PA	3	14	83	0,1662
Brasil (São Paulo)	2	10,2	87,8	0,0210*
Portugal	1	15	84	0.3348
Argentina (Buenos Aires)	0	11,5	88,5	0,0402*
Venezuela	0	10,9	89,1	0,0402*
Italia (Central)	1,4	10	88,6	0,0426*
Italia (Torino)	2,9	10	87,1	0,0301*
Inglaterra	2	15	83	0,2485
Alemanha	0	15	85	0,1916
Grécia	0	12	88	0,0643
USA Americanos Africanos	3,3	14,4	82,1	0,2241
Bulgária	3,4	6,4	90,2	0,0043*
Israel	0	10,4	89,6	0,0238*
Taiwan (Ami)	0	0	100	< 0.0001*
Taiwan (Atayal)	0	0	100	< 0.0001*
Taiwan (Hakka)	0	0	100	< 0.0001*
Taiwan (Minnan)	0	0	100	< 0.0001*
Taiwan (Tsou,)	0	0	100	< 0.0001*
Taiwan (Yami)	0	0	100	< 0.0001*
Hong Kong (Chinese)	0	0	100	< 0.0001*
Korea do Sul	0	0	100	< 0.0001*

<http://www.nanea.dk/cytokinesnps/>, 24/09/2008

O grupo de doadores de sangue que constituiu o grupo controle para o grupo de pacientes com PC ,quanto a frequência genotípica do códon 10 e códon 25

do gene do TGF- $\beta$ 1, difere de alguns grupos populacionais já analisados. Porém o grupo controle para o grupo de pacientes com PA se assemelha nesse aspecto ao grupo de doadores de sangue.

## 7.2. CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE PACIENTES E CONTROLES

A faixa etária entre os pacientes com PC e com PA é diferente (FEVEREIRO *et al.*, 2000; SZUSTER-CIESIESKA *et al.*, 2000). Neste estudo a média de idade do grupo de PC foi de 45,5 anos no gênero masculino e 42 anos no gênero feminino, o que está de acordo com os dados encontrados na literatura (SZUSTER-CIESIESKA *et al.*, 2000). Como na PC o consumo de bebidas alcoólicas é o fator etiológico mais prevalente, é possível que o indivíduo que inicia o hábito de beber ao final da adolescência, atinja as alterações no pâncreas que permitam o diagnóstico de PC após alguns anos, resultando nessa faixa etária. A média de idade dos pacientes com PA foi 54,2 anos no gênero masculino e 48,9 anos no gênero feminino, o que está de acordo com os dados encontrados na literatura (FEVEREIRO *et al.*, 2000).

O número de mulheres foi maior no grupo de pacientes com PA (21 mulheres e 11 homens) que no grupo de pacientes com PC (seis mulheres e 57 homens). Essa diferença era esperada devido aos critérios de seleção usados no grupo de pacientes com PA, no qual excluía os pacientes com etiologia alcoólica e com história de PC prévia. Fevereiro e colaboradores (2000), referem à etiologia alcoólica como predominante nos indivíduos do gênero masculino e litíase biliar no gênero feminino. Assim, a exclusão da etiologia alcoólica contribuiu para maior número de mulheres nesse grupo de pacientes com PA.

Devido a essas diferenças nas faixas etárias e gênero, foi necessário constituir grupos de controles diferenciados para cada patologia.

Doadores voluntários de sangue tem constituído o grupo controle de diversos estudos em humanos. A legislação brasileira permite a doação de sangue dos 18 aos 65 anos, porém é mais freqüente entre os 25 e 45 anos, assim como, há maior prevalência de doadores do gênero masculino. Ao comparar essas características do grupo de doadores de sangue com as do grupo de pacientes com



PC, foi identificado que são semelhantes. Isso permitiu utilizar o grupo de doadores de sangue como controle para o grupo de pacientes com PC. Diferentemente, para o grupo de pacientes com PA, foi necessário selecionar os controles pareando quanto à etnia, idade e gênero, entre o grupo de doadores de sangue e em um grupo de “Terceira Idade”.

A população de Salvador é composta em sua maioria de indivíduos mestiços descendentes de negros africanos, índios, caucasianos portugueses e espanhóis, além de uma pequena contribuição de franceses, holandeses e ingleses, o que ocasionou grande miscigenação de etnias. Estudos realizados em relação à frequência dos polimorfismos avaliados neste estudo, em indivíduos sadios em diversas populações, apontam algumas diferenças entre grupos étnicos (Tabelas 5 e 6).

A caracterização étnica dos pacientes e indivíduos dos grupos controles foi realizado de acordo com os critérios de Krieger e colaboradores (1965) por dois entrevistadores treinados no ambulatório de Genética do C-HUPES. A utilização desta classificação nesta linha de pesquisa tem como objetivo verificar se os grupos que estão sendo comparados são semelhantes, e permitir assim inferir que as diferenças encontradas entre eles são relativas ao que está em análise e não a diferenças populacionais.

### 7.3. O FENÓTIPO PREVISTO DO POLIMORFISMO NO CÓDON 10 E NO CÓDON 25 DO TGF- $\beta$ 1 ESTÁ ASSOCIADO A PANCREATITE CRÔNICA

No estudo inicial com indivíduos com PC (BENDICHO *et al.*, 2005), foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0471$ ) entre os alelos T e C (códon 10), e entre o fenótipo previsto de alto produtor de TGF- $\beta$ 1 e intermediário e baixo ( $p=0,088$ ), quando feita comparação entre indivíduos com PC e doadores de sangue. Essa tendência já tinha sido apontada num estudo anterior (SCHENEIDER *et al.*, 2004). Posteriormente, Farkas e colaboradores (2007) identificaram uma maior frequência do alelo T no TGF- $\beta$ 1 em pacientes com PC. Nesta fase do estudo, após o aumento do número de indivíduos no grupo de pacientes e de controles, foi

confirmada a diferença estatisticamente significativa entre o fenótipo previsto de alto produtor e os outros fenótipos ( $p=0,0172$ ) ao comparar o grupo de PC e de doadores de sangue.

Estes dados são compatíveis com os resultados de estudos que mostram aumento da expressão do TGF- $\beta$ 1 em pâncreas de indivíduos ou animais com Pancreatite crônica (SLATER *et al.*, 1995; SANVITO *et al.*, 1995; SATOH *et al.*, 1998); e sua atuação na fibrogenese (BLOBE *et al.*, 2000; NAGASHIO *et al.*, 2004; DETLEFSEN *et al.*, 2006; RANE *et al.*, 2006). Isso vem corroborar com os dados encontrados neste estudo que apontaram a diferença estatisticamente significativa apenas quando é feita a comparação do grupo de os pacientes com PC com os controles e não entre as outras comparações realizadas. Assim, é possível levantar a hipótese de que o polimorfismo no gene para esta citocina pode ser um fator determinante da sua produção.

Outra doença em que ocorre a formação de fibrose é a hepatite C (HCV). Gewaltig e colaboradores (2002) estudaram a associação do polimorfismo do TGF- $\beta$ 1 com a taxa de indução de fibrose no fígado de pacientes com HCV, e observaram que o processo de fibrose era três vezes mais rápido no grupo de pacientes com genótipo GC no códon 25 do que no grupo de controles. Um estudo realizado em Salvador, identificou associação do polimorfismo do TGF- $\beta$ 1 no códon 25 com a infecção com vírus C da hepatite, com maior frequência do alelo G nestes pacientes (PEREIRA *et al.*, 2008).

As células estelares do pâncreas quando ativadas se transformam em miofibroblastos e produzem TGF- $\beta$ 1 (HARBER *et al.*, 1999; DETLEFSEN *et al.*, 2006). Essas células têm sido comparadas com às células estelares do fígado, o que pode justificar a observação da fibrose no fígado como fonte de informação para o entendimento do processo que acontece no pâncreas.

Como foi identificada uma diferença entre o grupo de pacientes com PC e doadores de sangue, esse grupo controle foi comparado a outros grupos populacionais quanto à frequência genotípica no códon 10 e no códon 25. Foi possível confirmar que há diferenças entre as populações (tabelas 5 e 6). Isto reforça a necessidade de utilizar um grupo controle da mesma constituição populacional do grupo de pacientes para que as diferenças encontradas nesses estudos seja referente ao objeto da observação e não a diferenças populacionais.

Quanto ao genótipo do códon 25, foi verificado que alguns grupos populacionais como de Taiwan, Hong-kong e Korea do Sul, não são polimórficos, fato já descrito por Wang e colaboradores (2005).

#### 7.4. A IL-6 PROVAVELMENTE DESEMPENHA UMA AÇÃO ANTIINFLAMATÓRIA NA PANCREATITE CRÔNICA

Neste estudo, todos os pacientes com PC apresentaram o fenótipo previsto de alto produtores de IL-6 com diferença estatisticamente significativa ao ser comparado com o grupo de doadores de sangue ( $p=0,0450$ ) e com o grupo de PA ( $p=0,0010$ ). O grupo de pacientes com PA não mostrou diferença estatisticamente significativa ao ser comparado ao grupo de controles pareados. Inicialmente, era esperado que a maior frequência fosse identificada no grupo de pacientes com PA, já que é uma doença inflamatória aguda e que a dosagem de IL-6 nas primeiras horas do processo está associada a gravidade da PA (STIMAC *et al.*, 2006). Esses dados levam a crer que a PA está associada a um aumento de IL-6, mas que essa característica não é relativa ao polimorfismo desta citocinas. Na PC, pode ser que a ação da IL-6 seja anti-inflamatória, e que essa citocina atue inibindo a IL-1 e TNF- $\alpha$ , o que poderia causar um processo mais lento de dano no pâncreas, porém mantido. Dessa maneira os pacientes teriam o perfil da doença crônica característica da PC. Jablonowska e colaboradores (2008) visualizaram a presença intensa de IL-6 nas células do infiltrado inflamatório em pacientes com PC, o que reforça a possibilidade de sua ação nessa doença. A ação antiinflamatória da IL-6 tem sido apontado em diversos estudos (TILG *et al.*, 1994; 1997; Cuzzocrea *et al.*, 2002). O exposto, mais que resposta aos achados, tem um caráter especulativo e deverá ser melhor analisado frente a outros estudos.

Diferentemente deste estudo, Talar-Wojnarowska e colaboradores (2008) não identificaram diferenças no polimorfismo no gene da IL-6 em pacientes com PC. Uma provável explicação para essa divergência de resultados pode ser as diferenças populacionais.

## 7.5. O POLIMORFISMOS ANALISADOS NOS GENES DAS CITOCINAS IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ E IL-10 NÃO ESTÃO ASSOCIADOS AS PANCREATITES

Alguns estudos verificaram a possível associação do polimorfismo do gene da TNF- $\alpha$  na PA e não identificaram diferenças ao comparar com controles, porém ao comparar o grupo de pacientes com PA grave e o grupo com PA leve, houve divergência, entre os diferentes estudos (SARGEN *et al.*, 2000; POWELL *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2003; BALOG *et al.*, 2005; TUKIAINEN *et al.*, 2008). Neste estudo, não houve diferença ao comparar o grupo com PA e os controles, mas não foi realizado o agrupamento de pacientes com PA grave e comparado a PA leve, devido ao pequeno número de pacientes graves incluídos.

Os estudos realizados com polimorfismos no gene da IL-10 igualmente a este, não identificaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (SARGEN *et al.*, 2000; SCHNEIDER *et al.*, 2004; ZANGH *et al.*, 2005).

A ausência de associação entre dos polimorfismos nos genes das citocinas estudadas, pode ser devido a que esses não serem marcadores para essas doenças. Pode haver outro polimorfismo que esteja associado ou ainda, pode não ser uma diferença genética responsável pela atuação dessas citocinas na PA e na PC.

Os polimorfismos alélicos, genotípicos e os fenótipos previstos dos genes do IFN- $\gamma$  (+874T/A), não apresentaram diferenças das frequências entre pacientes com pancreatite crônica, pancreatite aguda e controles. Um estudo realizado por Scheneider e colaboradores (2004), em pacientes com PC alcoólica, não identificou diferenças nesse polimorfismo.

## 7.6 ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO PARA AVALIAR A PRODUÇÃO DE CITOCINAS *IN VITRO* EM PACIENTES COM PANCREATITES

Os achados relativos a genotipagem de citocinas, direcionou este estudo a verificar *in vitro* o comportamento dos fenótipos previstos identificados nesses

pacientes com pancreatite. Em pacientes com pancreatite, este tipo de estudo é escasso, o que leva a executar experimentos preliminares para adequação do protocolo a ser utilizado.

Os dados obtidos, devido ao pequeno número de pacientes incluídos, impossibilita a utilização de testes estatísticos resultantes da comparação entre os grupos. Com estes resultados é possível analisar o protocolo utilizado a fim de estabelecer as condições adequadas a serem utilizadas na realização de um projeto de pesquisa com essa vertente.

Os estudos *in vitro* permitem verificar a produção de citocinas pelas células de sangue periférico ativadas em cultura com e sem estímulo, analisar a capacidade proliferativa dessas células ou estudar a sua mitogênese, porém esta abordagem, objetiva apenas quantificar citocinas no sobrenadante da cultura de células.

Como protocolo inicial, foi utilizada a cultura de sangue total com acréscimo apenas do estímulo. Alguns autores trabalham com monomorfonucleares (HEIJINK *et al.*, 2002; HASEGAWA *et al.*, 2004; GRYGORCZUK *et al.*, 2007), outros com sangue total (LAVEDA *et al.*, 2005). A escolha no presente estudo se fundamentou na experiência da utilização desse modelo em estudos anteriores deste mesmo grupo de pesquisa com resultados comparáveis.

Os estímulos utilizados foram LPS e PWM. O LPS ativa linfócitos T e o PWM, os linfócitos T e B. Essa pode ser a razão pela qual a dosagem de citocinas na cultura com PWM foi mais elevada. Assim, foi possível verificar o comportamento das células sem estímulo, dos linfócitos T e dos linfócitos T junto com linfócitos B. A escolha dos estímulos é realizada de acordo com alguns critérios como o tipo celular que se quer ativar, a citocina que será dosada e a padronização estabelecida pelo grupo de pesquisa. Os estudos de produção de citocinas *in vitro* utilizam diversos estímulos como LPS (HEESEN *et al.*, 2002), PHA (LAVEDA *et al.*, 2005; GRYGORCZUK *et al.*, 2007), antígenos específicos (GRYGORCZUK *et al.*, 2007).

Na literatura há referência da proteína associada a pancreatite (PAP) como tendo participação na patogênese da pancreatite (CLOSA *et al.*, 2007) e também sobre o mecanismo de ativação das células acinares pelo etanol (ETEMAD & WHITCOMB, 2001; WHITCOMB, 2004). A utilização desses fatores como estímulo pode ser uma alternativa, porém são necessários estudos para verificar como ocorre essa ativação *in vitro*, visto que há diferenças entre as condições *in vivo* e *in vitro*.

Um estudo avaliando o perfil de síntese de citocinas de acordo com a gravidade da PA, (LAVEDA *et al.*, 2005), em cultura de sangue total, dosou TNF- $\alpha$ , IL6, IL8 e IL10. Os autores concluíram que a medida das citocinas na cultura estimulada e não estimulada, permite estimar o estado pré-ativado e a capacidade funcional e que a produção de citocinas foi diferente nas culturas de células de pacientes com PA grave e leve, sugerindo que a síntese de citocinas antiinflamatórias nos casos graves está diminuída. Estas diferenças apontadas, contribuem para dar continuidade ao estudo dessa abordagem.

## 8. CONCLUSÕES

As diferenças identificadas na seleção e classificação dos pacientes com pancreatite aguda e pancreatite crônica apontam a necessidade de um consenso para possibilitar a comparação dos estudos realizados nos diferentes centros especializados.

Os polimorfismos do gene do TGF- $\beta$ 1 no codon 10 e 25 podem ser um marcador de risco da Pancreatite crônica, confirmando o estudo anterior.

Os polimorfismos dos genes do IFN- $\gamma$  (+874T/A), do TNF- $\alpha$  (-308G/A) e da IL-10 (-1082G/A, -819T/C e -592C/A), não são marcadores de predisposição hereditária da pancreatite crônica e aguda.

## REFERENCIAS:

1. ALLEN RD. Polymorphism of the human TNF- $\alpha$  promoter – random variation or functional diversity? *Mol Immunol*; 36: 1017-1027,1999.
2. APTE M.V., HABER P.S., DARBY S.J., RODGERS S.C., MCCAUGHN G.W., KORSTEN M.A., PIROLA R. C., WILSON J.S. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut*; 44:534-541, 1999.
3. APTE M.V., WILSON J.S. Stellate Cell Activation in Alcoholic Pancreatitis. *Pancreas*.27:316–320, 2003.
4. AWAD M, EL-GAMEL A, HASLETON P, TURNER D, SINNOTT P, HUTCHINSON I. Genotypic variation in the Transforming Growth Factor-[beta]<sup>1</sup> Gene: Association with Transforming Growth Factor-[beta]<sup>1</sup> Production, Fibrotic Lung Disease, and Graft Fibrosis after Lung Transplantation. 66: 1014-1020, 1998
5. AWAD M, PRAVICA V, PERREY C, EL GAMEL A, YONAN N, SINNOTT PJ, HUTCHINSON IV. CA Repeat Allele Polymorphism in the First Intron of the Human interferon- $\gamma$  Gene Is Associated with Lung Allograft Fibrosis. *Hum Immunol*; 60; 343-346, 1999.
6. AWATA T, et al. Association of polymorphism in the interferon- $\gamma$  gene with IDDM. *Diabetologia*; 37:1159-62 1994.
7. BAAN CC, BALK AHMM, HOLWEG CTJ, RIEMSDIJK IC, MAAT LPWM, VANTRIMPONT PJMJ, NISTERS HGM, WEIMAR W. Renal Failure after Clinical Heart Transplantation is Associated with the TGF- $\beta$ 1 Codon 10 Gene Polymorphism. *Clin Heart Transplant*; 19(9): 866-872, 2000.
8. BALOG A., GYULAI Z., BOROS L.G., FARKAS G., TAKA T., LONOVICS J., MA NDI Y. Polymorphism of the TNF-a, HSP70-2, and CD14 Genes Increases Susceptibility to Severe Acute Pancreatitis. *Pâncreas*. 30(2): e46-e50, 2005.
9. BAYLEY JP, ROOIJ H, ELSEEN PJ, HUIZINGA TWJ, VERWEIJ CL. Functional analysis of Linker-Scan mutants Spanning the – 376, -308, -244, and –238 polymorphic sites of the TNF- $\alpha$  promoter. *Cytokine*; 14: 316-323, 2001.
10. BAMBA T, YOSHIOKA U, INOUE H, IWASAKI Y, HOSODA S. Serum levels of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 in patients with chronic pancreatitis. *J Gastroenterol*; 29: 314-319, 1994.
11. BEHRMAN SW. & FOWLER ES. Pathophysiology of Chronic Pancreatitis *Surg Clin N Am* 87:1309–1324, 2007.



12. BENDICHO M. T., GUEDES J., LEMAIRE D. C., *et al.*; Polymorphism of cytokine genes ( IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  and INF- $\gamma$ ) in Patients with chronic Pancreatitis). *Pancreas*, 2005.
13. BERANEK A H., TEICHA N., WITTB H., SCHULZC H.U., MOSSNER J., vKEIMA K. Analysis of tumour necrosis factor alpha and interleukin 10 promotor variants in patients with chronic pancreatitis. *Eur J Gastro Hepat*, 15 (11), 2003.
14. BERGHE WV, VERMEUDEN L, WILDE GD, BOSSCHER KD, BOONE E, HAEGMAN. Signal Transduction by Tumor Necrosis Factor and Gene Regulation of the Inflammatory Cytokine Interleukin-6. *Biochemical Pharmacology*; 60: 1185-1195, 2000.
15. BITTENCOURT PL, PALÁCIOS SA, CANÇADO ELR, PORTA G, DRIGO S, CARRILHO FJ, LAUDANNA AA, KALIL J, GOLDBERG AC. Autoimmune hepatitis in Brazilian patients is not linked to tumor necrosis factor  $\alpha$  polymorphisms at position – 308. *J. Hepatol*; 35: 24-28, 2001.
16. BOEHM U, KLAMP T, GROOT M, HOWARD JC. Cellular responses to interferon- $\gamma$ . *Annu Rev Immunol*; 15:749-795, 1997.
17. BROWN RA, SETHI KK, GWANMESIA I, RAEMDONCK D, EASTWOOD M, MUDERA V. Enhanced Fibroblast Contraction of 3D Collagen Lattices and Integrin Expression by TGF- $\beta$ 1 and  $\beta$ 3: Mechanoregulatory Growth Factors? *Exp Cell Res*; 274: 310-322, 2002.
18. BHATANAGAR A., WIG J.D., MAJUDAMDAR S. Immunological findings in acute and chronic pancreatitis. *ANZ J. Surg.*; 73: 59-64, 2003.
19. BIDWELL J, KEEN L, GALLAGHER G, KIMBERLY R, HUIZINGA T, MCDERMOTT MF, OKSENBERG J, MCNICHOLL J, POCIOT F. HARDT C. D'ALFONSO S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes and Immunity*; 1: 3-19, 1999.
20. BIDWELL J, KEEN L, GALLAGHER G, KIMBERLY R, HUIZINGA T, MCDERMOTT MF, OKSENBERG J, MCNICHOLL J, POCIOT F. HARDT C. D'ALFONSO S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 1. *Genes and Immunity*; 2: 61-70, 2001.
21. BLOBE G.C., SCHIEMANN W., LODISH H.F. Role of Transforming Growth Factor *b* in human disease. *N Engl J Med*, 343(228):1350-1359, 2000.
22. CABRERA M, SHAQW M A, SHARPLES C, WILLIAMS H, CASTES M, CONVIT J, BLACKWELL JM. Polymorphism in Tumor Necrosis Factor Genes Associated With Mucocutaneous Leishmaniasis. *J Exp Med*; 182: 1259-1264, 1995.

23. CAMBIEN F, RICARD S, TROESCH A, MALLET C, GENERENAZ L, EVANS A, ARVEILER D, LUC G, RUIDAVETS JB, POIRIER O. Polymorphisms of the Transforming Growth Factor- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1) Gene in Relation to Myocardial Infarction and Blood Pressure: The Etude Castemoin de l'infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Hypertension*; 28(5): 881-887, 1996.
24. CANTAGREL A, NAVAUX F, LOUBET-LESCOULIÉ P, NOURHASHEMI FENAULT G, ABBAL M, CONSTANTIN A, LAROCHE M, MAZIÈRES B. Interleukyn-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphis: Relationship to occurrence and severity of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 42: 1093-1100, 1999.
25. CARNEIRO M.C., BATISTA R.S. O mosaico patogênico da Pancreatite Aguda. *Rev. Col. Bras. Cir.*; 31(6): 391-397, 2004.
26. CARNEIRO M.C.C, MANSO J.E.F., EULÁLIO J.M.R., RENTERIA J.M., COSTA M.D. O papel da avaliação inicial simplificada no prognóstico da pancreatite aguda. *Rev. Col. Brás. Cir.* 33(3): 161-168,2006.
27. CARTWRIGHT N, DEMAINE A, JAHROMI M, SANDERS H, KAMINSKI ER. A study of cytokine protein secretion, frequencies of cytokine expressing cells and IFN-gene polymorphisms in normal individuals. *Transplantation*; 68: 1546-1552, 1999.
28. CHEN C.C.,WANG S.S., LU R.H., CHANG F. Y., LEE S.D. Serum interleukin 10 and 11 in patients with acute pancreatitis. *Gut.* 45:895-899, 1999.
29. CHOWDHURY P., GUPTA P. Pathophysiology of alcoholic pancreatitis: An overview. *World J Gastroenterol*; 12(46): 7421-7427, 2006.
30. CLOSA D., MOTOO Y, IOVANNA J.L.Pancreatitis-associated protein: From a lectin to an anti-inflammatory cytokine.*World J Gastroenterol*,13(2): 170-174, 2007
31. CONTI P, KEMPURAJ D, KANDERE K, GIOACCHINO MD, BARBACANE RC, CASTELLANI ML, FELACO M, BOUCHER W, LETOURNEAU R, THEOHARIDES TC. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunol Letters* ; 86: 123-129, 2003.
32. CUNHA S, CODES L, CAVALCANTI A.R, SOARES MA, MENEZES TA, REIS IC, OLIVEIRA EJJ, QUEIROZ MT, ZOLLINGER CC & BITTENCOURT PL. Pancreatite Aguda: Relato de Casuística de Centro de Referência da Bahia. VI Semana Brasileira do Aparelho Digestivo ,2004.
33. CUZZOCREA S., MAZZON E., DUGO L., CENTORRINO T., CICCOLO A., MCDONALD M.C., SARRO A.,CAPUTI A.P., THIEMERMANN C. Absence of endogenous interleukin-6 enhances the inflammatory response during acute pancreatitis induced by cerulein in mice. *Cytokine*, 18(5): 274–285, 2002.
34. DANI R., MOTT C.B., GUARITA D.R., NOGUEIRA C.E.D.Epidemiology and Etiology of Chronic Pancreatitis in Brazil: A Tale of Two Cities. *Pâncreas.* 5(4): 474-478, 1990.

35. DE BEAUX A.C., GOLDIE A.S., ROSS J.A., CARTER D.C., FEARON K.C.H., Serum concentration of inflammatory mediators related to organ failure in patients with acute pancreatitis. *The British journal of Surgery*. 83(3):349-353, 1996.
36. DEMOLS A, LAETHEM JLV, QUERTINMONT E, DEGRAEF C, DELHAYE M, GEERTS A, DEVIERE J. Endogenous interleukin-10 modulates fibrosis and regeneration in experimental chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 282: G1105-G1112, 2001.
37. DETLEFSEN S, SIPOS B., FEYERABEND B., KLOPPEL G. Fibrogenesis in alcoholic chronic pancreatitis: the role of tissue necrosis, macrophages, myofibroblasts and cytokines. *Modern Pathology* 19, 1019–1026, 2006.
38. ELFAR M., GABER L.W., SABEK O., FISCHER C.P., GABER A.O. The Inflammatory Cascade in Acute Pancreatitis: Relevance to Clinical Disease. *Surg Clin N Am* 87: 1325-1340, 2007.
39. EL-GAMEL A, AWAD MR, HASLETON PS, YONAN NA, HUTCHISON JA, CAMPBELL CS, RAHMAN AH, DEIRANIYA AK, SINNOTT P, HUTCHISON IV. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) Genotype and Lung Allograft Fibrosis. *J Heart and Lung Transplant*; 18(6): 518-523, 1999.
40. ETEMAD B., WHITCOMB D.C. Chronic Pancreatitis: Diagnosis, Classification, and New Genetic Developments. *Gastroenterol*. 120: 682 -707, 2001.
41. ESKDALE J, KUBE D, TESCH H, GALLAGHER G. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics*; 46: 120-128, 1997.
42. FANTINI L., TOMASSETTI P., PEZZILLI R. Management of acute pancreatitis in clinical practice: current knowledge and future perspectives. *World J Emergency Surgery*. 1:16,2006.
43. FARKAS JR G., HOFNER P., BALOG A, TAKÁCS T, SZABOLCS A., FARKAS G., MÁNDI Y. Relevance of transforming growth factor- $\beta$ 1, interleukin-8, and tumor necrosis factor- $\alpha$  polymorphisms in patients with chronic pancreatitis. *Eur. Cytokine Netw.*, 18(1): 1-7, 2007.
44. FEVEREIRO T., CAIXAS U., PINTO I.V. Epidemiologia da pancreatite aguda na unidade de cuidados intensivos. *Revista Portuguesa de Medicina Intensiva*. 9(2): 119-121, 2000.
45. FISHMAN D, FAULDS G, JEFFERY R, MOHAMED-ALI V, YUDKIN JS, HUMPHRIES S, WOO P. The effect of novel polymorphism in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and association with Systemic-Onset Juvenile Chronic Arthritis. *The Journal of Clinical Investigation*; 102(7): 1369-1376, 1987.

46. FROSSARD J.L., HADENGUE A. , PASTOR C.M. New Serum Markers for the Detection of Severe Acute Pancreatitis in Humans. *Am. J. Respir Crit Care Méd.* 164:162-170,2001.
47. FROSSARD J.L., STEER M.L., PASTOR C.M. Acute pancreatitis. *Lancet*, 371: 143–52, 2008.
48. GARCIA PM, SAKAMOTO KM. Cell Signaling Defects and Human Disease. *Molecular Genetics and Metabolism*; 66: 143-171, 1999.
49. GE D., YOU Z. Expression of interleukin-17RC protein in normal human tissues. *International Archives of Medicine* 1:19, 2008.
50. GERARD C. BLOBE , M.D., P H .D., WILLIAM P. S CHIEMANN, P H .D., AND HARVEY F. L ODISH , P. ROLE OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR *b* IN HUMAN DISEASE. *The New England Journal of Medicine*. May 4,1350- 1359, 2000.
51. GEWALTIG J, MANGASSER-STEPHAN K, CARTUNG C, BIESTERFELD S, GRESSNER AM. Association of polymorphisms of the transforming growth factor- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1) gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. *Clin Chim Acta*; 316: 83-94, 2002.
52. GIEDRAITIS V, HE B, HILLERT J. Mutation screening of interferon-gamma gene as a candidate gene for multiple sclerosis. *Europ J Immunogenetics*; 26: 257-259, 1999.
53. GOVINDEN R, BHOOLA KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor- $\beta$ 1. *Pharmacology & Therapeutics*; 98: 257-265, 2003.
54. GRAINGER D. J. et al., Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta 1. *Hum. Mol. Genet.* 8: 93-97, 1999.
55. GUNNETT CA, HEISTAD DD, BERG DJ, FARACI FM. IL-10 deficiency increases superoxide and endothelial dysfunction during inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 279: H1555-H1562, 2000.
56. GODINHO R. Etiopatogenia da Pancreatite Aguda. *Revista Portuguesa de Medicina Intensiva.* 9(2): 123-136, 2000.
57. GOUGH D.B., BOYLE B., JOYCE W.P., DELANEY C.P., MCGEENEY K.F., GOREY T.F. ET AL. Free radical inhibition and serial chemiluminiscence in envolving experimental pancreatitis. *Br. J Surg* . 77: 1256-9, 1990.
58. GOVINDENA R., BHOOLAB K.D. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-b. *Pharmacology & Therapeutics* 98: 257– 265, 2003.

59. GRANELL S., PEREDA J., GÓMEZ-CAMBRONERO L., CASSINELLO N., SABATER L., CLOSA D., SASTRE J. Circulating TNF- $\alpha$  and its soluble receptors during experimental acute pancreatitis. *Cytokine*. 25:187-191, 2004.
60. GRYGORCZUK S, CHMIELEWSKI T., ZAJKOWSKA J., ŚWIERZBIŃSKA R., PANCEWICZ S., KONDRUSIK M., TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA S., HERMANOWSKA-SZPAKOWICZ T. Concentration of TGF- $\beta$ 1 in the supernatant of peripheral blood mononuclear cells cultures from patients with early disseminated and chronic Lyme borreliosis. *Advances in Medical Sciences* 52: 174-178, 2007. .
61. GUEDES J.C., AMORIM C.A, CARVALHO C.E., PEREIRA M.L., BARBOSA V.R., BENDICHO M.T., LEMAIRE D.C. Características etiológicas e clínicas da Pancreatite Crônica em pacientes da Bahia. GED, 2006.
62. GUEDES J.C., BARBOSA V.R., CARVALHO C.E., AMORIM C.A, CARNEIRO A.A., LYRA A, MARBACK R, BENDICHO M.T Características etiológicas e clínicas da Pancreatite Aguda-estudo prospectivo. GED, 2006.
63. HABER P.S., KEOGH G.W., APTE M.V., MORAN C.S., STEWART N.L., CRAWFORD D.H.G., PIROLA C.R., MCCAUGHAN G.W., RAMM G.A., WILSON J.S. Activation of Pancreatic Stellate Cells in Human and Experimental Pancreatic Fibrosis *American Journal of Pathology*, 155(4),1999.
64. HADDAD JJ, SAADÉ NE, SARAFIEH-GARABEDIAN B. Interleukin-10 and regulation of mitogen-activated protein kinases: are these signaling modules targets for the anti-inflammatory action of this cytokine? *Cell Sign*; 15: 255-267, 2003.
65. HAJEER AH, LAZARUS M, TURNER D *et al.* IL-10 gene promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Sand J Rheumatol*. 27:142 – 145, 1998.
66. HAJEER AH, HUTCHINSON IV. Influence of TNF- $\alpha$  Gene Polymorphisms on TNF- $\alpha$  Production and Disease. *Hum Immunol*. 62: 1191-1199, 2001.
67. HAJEER AH, HUTCHINSON IV. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microscopy Research and Thechnique*; 50: 216-228, 2000.
68. HALLORAN P. & GOES , N. Interferon –  $\gamma$  and its receptor . *Transplantation Science*. 3:92.1993.
69. HASEGAWA M., SATO S., TAKEHARA K. Augmented production of transforming growth factor-B by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 296 : 89–93, 2004)
70. HAUKI N, BIDWELL J, SMIH .J.P, KEEN L, GALLAGHER G, KIMBERLY R, HUIZINGA T, MCDERMOTT MF, OKSENBERG J, MCNICHOLL J, POCIOT F. HARDT C. D'ALFONSO S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 2. *Genes and Immunity*; 3: 313-330, 2002.

71. HEESSEN M., BLOEMEKE B., HEUSSEN N, KUNZ D. Can the interleukin-6 response to endotoxin be predicted? Studies of the influence of a promoter polymorphism of the interleukin-6 gene, gender, the density of the endotoxin receptor CD14, and inflammatory cytokines. *Crit Care Med.* 30(3), 664-669, 2002
72. HEIJINK I.H., VELLENGA E., BORGER P., POSTMA D. S., MONCHY J. G. R. Interleukin-6 promotes the production of interleukin-4 and interleukin-5 by interleukin-2-dependent and -independent mechanisms in freshly isolated human T cells. *Immunology* 107:316–324, 2002.
73. HOLLEAARD M.V, BIDWELJ.L. , OKSENBERG J, MCNICHOLL J, POCIOT F. HARDT C. D'ALFONSO S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 3. *Genes and Immunity*; 2006.
74. HOLLOWAY AF, RAO S, SHANNON MF. Regulation of cytokine gene transcription in the immune system. *Mol Immunol*; 38: 567-580, 2001.
75. HOPKINS SJ. The pathophysiological role of cytokines. *Leg Méd*; 2002.
76. HUTCHINSON I.V. et al. Cytokine Genotypes in Allograft rejection: Guidelines for Immunosuppression. *Transplantation proceedings*; 30:3991-3992, 1998.
77. ISHIHARA K, HIRANO T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor*; 13: 357-368, 2002.
78. JABLONOWSKA M., MILNEROWICZ H., RABCZYNSKI J., MILNEROWICZ S., NABZDYK S., PATRZALEK D, MILNEROWICZ A. Immunohistochemical Localization of Interleukin-6 in Human Pancreatitis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 16:40–43, 2008.
79. JASTER R., Molecular regulation of pancreatic stellate cell function. *Molecular Cancer journal.* 3:26, 2004.
80. KEEN L J. The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. *Transplant Immunology*;10: 143-146, 2002a.
81. KEEN L J. The study of polymorphism in cytokine and cytokine receptor genes. 152-176, 2002b.
82. KINGSNORTH A. Role of cytokine and their inhibitors in acute pancreatitis. *Gut*; 40:1-4, 1997.
83. KLÖPPEL G., MAILLET B. Pathology of Acute and Chronic Pancreatitis. *Pancreas.*8(6):659-670, 1993.
84. KLÖPPEL G., MAILLET B. Chronic Pancreatitis: Evolution of the Disease. *Hepato-Gastroenterol.*; 38: 408-412, 1991.

85. KOTENKO SV. The family of IL-10 related cytokines and their receptors: related, but to what extent? *Cytokine Growth Factor Reviews*; 13: 223-240, 2002.
86. KIMURA Y., HIROTA M., OKABE A., INOUE K., KUWATA K., OHMURAYA M., OGAWA M. Dynamic aspects of granulocyte activation in acute pancreatitis *International Congress Series* 1255; 177– 181, 2003.
87. KOUSSOULAS V., TZIVRAS M., KARAGIANNI V., SPYRIDAKI E., PLACHOURAS D., GIAMARELLOU H., GIAMARELLOS-BOURBOULIS E J. Monocytes in systematic inflammatory response syndrome: Differences between sepsis and acute pancreatitis. *World j Gastroenterol.* 7(41): 6711-6714,2006.
88. KRIEGER h., MORTON n.e., AZEVEDO e., FREIRE-MAIA a., YASUDA N. Racial admixture in north-eastern Brazil .*Ann. Hum. Genet., Lond.* 29, 113-125, 1965.
89. KROEGER KM, STEER JH, JOYCE DA, ABRAHAM LJ. Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. *Cytokine*; 12: 110-119, 1999.
90. LAVEDA R., MARTÍNEZ J., MUÑOZ C., PENALVA J.C., SÁEZ J., BELDA G., NAVARRO S., FEU F., MAS A., PALAZÓN J.M., SÁNCHEZ-PAYÁ J., SUCH J., PÉREZ-MATEO M. Different profile of cytokine synthesis according to the severity of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*11(34):5309-5313,2005.
91. LAZARUS R, KLIMECKI WT, PALMER LJ, KWIATKOWSKI DJ, SILVERMAN EK, BROWN A, MARTINEZ F, WEISS ST. Single-Nucleotide Polymorphisms in the Interleukin-10 Gene: Differences in Frequencies, Linkage Disequilibrium Patterns, and Haplotypes in Three United States Ethnic Groups. *Genomics*; 80: 223-228, 2002.
92. LEINDLER L., MORSCHL E., LÁSZLÓ F, MÁNDI Y, TAKÁCS T, JÁRMAI K, FARKAS G. Importance of Cytokines, Nitric Oxide, and Apoptosis in the Pathological Process of Necrotizing Pancreatitis in Rats. *Pancreas*;29:157–161, 2004.
93. LEUNG .S.& IP S.P. Pancreatic acinar cell: Its role in acute pancreatitis. *Int J. Biochem Cell Biology*; 38: 1024-1030, 2006.
94. LI B, KHANNA A, SHARMA V, SINGH T, SUTHANTHIRAN M, AUGUST P. TGF-beta<sub>1</sub> DNA Polymorphisms, Protein levels, and blood Pressure. *Hypertension*; 33(1S): 271-275, 1999.
95. LIM S, CRAWLEY E, WOO P, BARNES PJ. Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma[letter]. *Lancet*; 352: 113, 1998.
96. LINDLEY K.J. Chronic Pancreatitis. *Indian J. Pediatr.*; 73(10):907-912, 2006.
97. LIO D, MARINO V, SERAUTO A, GIOIA V, SCOLA L, CRIVELLO A, FORTE GI, COLONNA-ROMANO G, CANDORE G, CARUSO C. Genotype frequencies of

the +874T→A single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon- $\gamma$  gene in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis. *Europ J Immunogenetics*; 29: 371-374, 2002.

98. MAYER J., LAINE J.O., RAU B., HOTZ G., FOITZIK T., NEVALAINEN T.J., BEGER H. G. Systemic Lymphocyte Activation Modulates the Severity of Diet-Induced Acute Pancreatitis in Mice. *Pancreas*. 19(1):62-68,1999.

99. MAYER J., RAU B., GANSAUGE F., BEGER H. G. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications. *Gut*. 47:546-552, 2000.

100. MASSAGUÉ J. The TGF- $\beta$  pathway in basic oncology. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.*, 71: 525-534, 2005.

101. MÄURER M, KRUSE N, GIESS R, TOYKA KV, RIECKMANN P. Genetic variation at position – 1082 of interleukin 10 (IL10) promotor and outcome of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*; 104: 98-100, 2000.

102. McGUIRE W, HILL AV, ALLSOPP CE, GREENWOOD BM, KWIATKOWSKI D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature*; 371: 508-510, 1994.

103. MEGE J.L., MEGHARI S., HONSTETTRE A., CAPO C., RAOULT D. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet*. 6: Sep, 2006

104. MITCHELL, R. M. S., BYRNE M.F., BAILLIE J. Pancreatitis. *Lancet*. 361: 1447-55, 2003.

105. MOCELLIN S, PANELLI MC, WANG E, NAGORSEN D, MARINCOLA FM. The dual role of IL-10. *Trends in Immunology*; 24: 36-43, 2003.

106. MOK CC, LANCHBURY JS, CHAN DW, LAU CS. Interleukin-10 promoter polymorphisms in Southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*. 41: 1090 – 1095, 1998.

107. MOLERO X., VAQUERO E., GÓMEZ J.Á., ALONSO A., GUARNER Nuevos horizontes en los mecanimos de la lesion aguda y crónica del páncreas. *Gastroenterol Hepatol*; 2(7) 437-46, 2003.

108. MORA-GARCIA P, SAKAMOTO KM. Cell Signaling Defects and Human Disease. *Mol Gen Met*; 66: 143-171, 1999.

109. MORGUN A, GONÇALVES-PRIMO A, SCHULZHENKO N, RAMPIM G, GERBASE-DELIMA G. Novel linkage disequilibrium between TNF-308 and HLA-B in Brazilian Blacks. *Human Immunology*; 64:10 Supplement 1, S173, 2003.



110. NAGASHIO Y., UENO H., IMAMURA M., ASAUMI H., WATANABE S., YAMAGUCHI T., TAGUCHI M., TASHIRO M., OTSUKI M. Inhibition of transforming growth factor  $\beta$  decreases pancreatic fibrosis and protects the pancreas against chronic injury in mice. *Laboratory Investigation* 84; 1610–1618, 2004.
111. OLIVIERE F, BONAFE M, CAVALLONE L, GIOVAGNETTI S, MARCHEGANI F, CARDELLI M, MUGIANESI E, GIAMPIERI C, MORESI R, STECCONI R, LISA R, FRANCESCHI C. The  $-174$  C/G locus affects in vitro/in vivo IL-6 production during aging. *Experimental Gerontology*; 37: 309-314, 2002.
112. OLLIER W.E.R. Cytokine genes and disease susceptibility. *Cytokine* 28:174-178,2004.
113. OMER FM, KURTZHALS JAL, RILEY EM. Maintaining Immunological Balance in Parasitic Infections: A Role for TGF- $\beta$ ? *Parasitology Today*; 16: 18 – 23, 2000.
114. OMARY M.B., LUGEA A., LOWE A. W., PANDO S.J. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J. Clin. Inv.* ; 117: 50 – 59, 2007.
115. OUYANG W, KOLLS J. K., ZHENG Y. The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. *Immunity* 28, 2008
116. PACHECO R.C., NISHIOKA S.A., OLIVEIRA L.C.M. Validade da amilase e da lipase no diagnóstico diferencial entre pancreatite aguda/crônica agudizada e outras causas de dor abdominal aguda. *Arq Gastroenterol.* 40(4): 233-238, 2003.
117. PANTSULAIA I, TROFIMOV S, KOBLYANSKY E, LIVISHITS G. Genetic and Environmental Influences on IL-6 and TNF- $\alpha$  Plasma Levels in Apparently Healthy General Population. *Cytokine*.;19: 138-146, 2002.
118. PAPACHRISTOU G.I., CLERMONT G., SHARMA A., YADAV D., WHITCOMB D.C. Risk and Markers of Severe Acute Pancreatitis. *Gastroenterol Clin N Am* 36: 277–296, 2007.
119. PEREIRA F.A., SILVA N.N.P., RODART I.F., CARMO T.M.A., LEMAIRE D.C., REIS M.G. Association of TGF- $\beta$ 1 Codon 25 (G915C) Polymorphism With Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Medical Virology* 80:58–64, 2008
120. PEZZILLI R., BILLI E., BELTRANDI E., MALDINI M.C., MANCINI R. Impaired Lymphocyte Proliferation in Human Acute Pancreatitis. *Digestion.* 58:431-436,1997.
121. PEZZILLI R., MALDINI M., MORSELLI-LASBATE A.M., BARAKAT B., ROMBOLI E., BELTRANDI E., MIGLIORI M., TOMASSETTI P., CORINALDESI R. Early Activation of Peripheral Lymphocytes in Human Acute Pancreatitis. *J. Clin. Gastroenterol.*36(4): 360-363,2003.
122. PHILLIPS P.A., WU M. J., KUMAR R.K., DOHERTY E., MCCARROLL J.A., PARK S., PIROLA R.C., WILSON J.S., APTE M.A.V. Cell migration: a novel aspect of pancreatic stellate cell biology. *Gut*; 52:677 – 682, 2003.

123. PIETRUCZUK M., DABROWSKA M.I., WERWSZCZYNSKA-SIEMIAWTKOWSKA U., DABROWSKA A. Alteration of peripheral blood lymphocyte subsets in acute pancreatitis. *World j Gastroenterol*; 12(33): 5344-5351, 2006.
124. POWELL J.J., FEARON K., SIRIWARDENA A.K., ROSS J.A. Evidence against a role for polymorphisms at tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist gene loci in the regulation of disease severity in acute pancreatitis. *Surgery* 129 (5) 633-640, 2001
125. PRAVICA V, ASDERAKIS A, PERREY C, HAJEER A, SINNOTT PJ, HUTCHINSON IV. In vitro production of IFN- $\gamma$  correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN- $\gamma$  gene. *Europ J Immunogenetics*; 26: 1-3, 1999.
126. PRAVICA V, PERREY C, STEVENS A, LEE JH, HUTCHINSON IV. A Single Nucleotide Polymorphism in the First Intron of the Human IFN- $\gamma$  Gene: Absolute Correlation with a Polymorphic CA Microsatellite Marker of High IFN- $\gamma$  . Production. *Hum Immunol*; 61: 863-866, 2000.
127. RAMOS A. Pancreatite Aguda Grave – Clínica. *Revista Portuguesa de Medicina Intensiva*. 9(2): 137-139, 2000.
128. RAMUDO L., MANSO M.A., VICENTE S., DE DIOS I. Pro- and anti-inflammatory response of acinar cells during acute pancreatitis. Effect of N-acetyl cystein. *Cytokine* 32:125-131, 2005.
129. RANE S.G., LEE J.H., LIN H.M. Transforming growth factor- $\beta$  pathway: Role in pancreas development and pancreatic disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 17:107–119, 2006.
130. RAU B., POCH B., GANSAUGE F., BAUER A., NUSSLER A.K., NEVALAINEN T. Pathophysiological role of oxygen free radicals in acute pancreatitis: initiating event or mediator of tissue damage? *Ann Surg* 231:352-360, 2000.
131. RUIZ-LINARES A. et al., Dinucleotide repeats polymorphism in the interferon-gamma (IFNG) gene. *Hum. Mol. Genet.* 2:1508, 1993.
132. SALUJA A.K., DONOVAN E.A., YAMANAKA K., YAMAGUCHI Y., HOFBAUER B., STEER M.L. Cerulein-Induced In Vitro Activation of Trypsinogen in Rat Pancreatic Acini Is Mediated by Cathepsin B. *Gastroenterol*; 113:304-310, 1997.
133. SANTOS J.S., ELIAS JUNIOR. J., SCARPELINI S. & SANKARANKUTTY A.K. Pancreatite aguda: atualização de conceitos e condutas. *Rev Medicina Ribeirão Preto*, 36: 266-282, 2003.
134. SANVITO F, HERRERA PL, HUARTE J, NICHOLS A, MONTESANO R, ORCI L VASSALI JD. TGF- $\beta$  1 influences the relative development of the exocrine and endocrine pancreas in vitro. *Development* 120, 3451-3462, 1994. ver titulo

135. SANVITO F, NICHOLS A, HERRERA PL, HUARTE J, WOHLWEND A, VASSALI JD, ORCI L. TGF- $\beta$ 1 overexpression in murine pancreas induces chronic pancreatitis and, together with TNF- $\alpha$ , triggers insulin-dependent diabetes. *Biochemical and Biophysical Research communications*; 217: 1279-1286, 1995.
136. SARGEN K, DEMAINE AG, KINGSNORTH AN. Cytokine Gene Polymorphisms in Acute Pancreatitis. *JOP*; 1(2): 24-35, 2000.
137. SARLES H., BERNARD J.P., GULLO L. Pathogenesis of chronic pancreatitis. *Gut*; 31:629-632, 1990.
138. SATOH K, SHIMOSEGAWA T, HIROTA M, KOIZUMI M, TOYOTA T. Expression of TGF- $\beta$ 1 and its Receptors in Pancreatic Duct Cell Carcinoma and in Chronic Pancreatitis. *Pancreas*; 16: 468-474, 1998.
139. SCHENEIDER A, BARMADA M.M., SLIVKA A, MARTIN J.A, WHITCOMB D.C. Analysis of tumor necrosis factor- $\alpha$ , transforming growth factor- $\beta$ , Interleukin-10 and interferon- $\gamma$  polymorphisms in patients with alcoholic chronic pancreatitis. *Alcohol*; 32: 19-24, 2004.
140. SLATER SD, WILLIAMSON RCN, FOSTER CS. Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in Chronic Pancreatitis. *Digestion*; 56: 237-241, 1995.
141. SMITHIES A.M., SARGEN K., DEMAINE A.G., KINGSNORTH A.N. Investigation of the Interleukin 1 Gene Cluster and its Association with Acute Pancreatitis. *Pancreas*; 3(20): 234-240, 2000.
142. SPORN M. B. The early history of TGF- $\beta$ , and a brief glimpse of its future. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 17: 3-7, 2006.
143. STANCZUK GA, TSWANA SA, BERGSTROM S, SIBANDA EN. Polymorphism in codons 10 and 25 of the transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) gene in patients with invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Eur J Immunol*; 29: 417-421, 2002.
144. STEINMAN L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature Medicine*. 13(2), 2007.
145. SYVÄNEN AC. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature Reviews Genetics*; 2: 930-942, 2000.
146. STIMAC D., FISIC E., MILIC S., BILIC-ZULLE L., PERIC R. Prognostic Values of IL-6, IL-8, and IL-10 in Acute Pancreatitis. *J Clin Gastroenterol*; 40:209-212, 2006.
147. SZUSTER-CIESIESKA A, DANILUK J, CURIE-SKODOWSKA M. Serum levels of cytokines in alcoholic liver cirrhosis and pancreatitis. *Arch Immunol Ther Exp*; 48:301-7, 2000.

148. TAKAYA H, ANDOH A, MAKINO J, SHIMADA M, TASAKI K, ARAKI Y, BAMBA S, HATA K, FUJIYAMA Y, BAMBA T. Interleukin-17 stimulates chemokine (interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1) secretion in human pancreatic periacinar myofibroblasts. *Scand J Gastroenterol.* 37(2):239-45, 2002.
149. TALAR-WOJNAROWSKA R., GASIOROWSKA A., SMOLARZ B., ROMANOWICZ-MAKOWSKA H., KULIG A., MALECKA-PANAS E. Clinical Significance of Interleukin-6 (Il-6) Gene Polymorphism and Il-6 Serum Level in Pancreatic Adenocarcinoma and Chronic Pancreatitis. *Dig Dis Sci*, 54(3): 683-689, 2008.
150. TESTONI P.A. Aetiologies of Recurrent Acute Pancreatitis: Acute or Chronic Relapsing Disease? *JOP*; 2(6):357-367, 2001
151. TILG H., DINARELLO C.A., MIER J.W. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *YMUNOLOGV TODAY*18(9):428-432, 1997
152. TRIVIÑO T., LOPES FILHO G. J., TORREZ F.R.A. Pancreatite aguda: o que mudou? *GED*; 21(2):69-76, 2002.
153. TUKIAINEN E., KYLANPAA M.L., PUOLAKKAINEN P, KEMPPAINEN E., HALONEN K., ORPANA A., METHUEN T., SALASPURO M., HAAPIAINEN R., REPO H. Polymorphisms of the TNF, CD14, and HSPA1B Genes in Patients With Acute Alcohol-Induced Pancreatitis. *Pâncreas*. 37(1): ,56-61,2008.
154. UEHARA S., GOTHOH K., HANDA H., TOMITA H., TOMITA Y. Acute Pancreatitis. Immune function inpatients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*; 18(4):363-370, 2003.
155. VACCARO MI, ROPOLO A, GRASSO D, CALVO EL, FERRERIA M, IOVANNA JL, LANOSA G. Pancreatic Acinar Cells Submitted to Stress Activate TNF- $\alpha$  Gene Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 268: 485-490, 2000.
156. VAN LAETHEM JL, DEVIERE J. Pancreatitis and cytokines. *Acta Gastroenterol Belg.* 59: 186-7, 1996
157. VODOVOTZ Y. Control of Nitric Oxide Production by Transforming Growth Factor- $\beta$ 1: Mechanistic Insights and Potential Relevance to Human Disease. *Biol Chem*1: 3-17, 1997.
158. WANG H., MENGSTEAB S., TAG C.G., GAO C.F., HELLERBRAND C., LAMMERT F., GRESSNER A.M., WEISKIRCHEN R. Transforming growth factor- $\beta$ 1 gene polymorphisms are associated with progression of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol* 11(13):1929-1936; 2005
159. WARLÉ MC, FAHAN A, METSELAAR J, HOP WCJ, PERREY C, ZONDERVAN PE, KAP M, KWEKKEBOOM J, IJZERMANS JNM, TILANUS HW,

PRAVICA V, HUTCHINSON I V, BOUMA GJ. Are Cytokine Gene Polymorphisms Related to In Vitro Cytokine profiles? *Liver Transplantation*; 9: 170-181, 2003.

160. WEISS F.U., HALANGK W., LERCH M.M. New advances in pancreatic cell physiology and pathophysiology. *Best Practice & Research Clin Gastroenterology*, 22(1):3-15, 2008

161. WILSON AG, SYMONS JÁ, McDOWELL TL, McDEVITT, DUFF GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci*: 94; 3195-3199, 1997.

162. WILSON AG, VRIES N, POCIOT F, GIOVINE FS, DUFF GW. An allelic Polymorphism within the Human Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ - Promotor Region Is Strongly Associated with HLA A1, B8, and DR3 Alleles. *J. Exp. Med*; 177: 557-560, 1993.

163. WITT H., APTE M.V., KEIM V., WILSON J.S. Chronic Pancreatitis: Challenges and Advances in Pathogenesis, Genetics, Diagnosis, and Therapy. *Gastroenterol* ;132:1557-1573, 2007.

164. WHITCOMB D C. Value of genetic testing in the management of pancreatitis. *Gut*. 53;1710-1717, 2004

165. WYNN T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*; 214: 199-210, 2008.

166. ZHANG D, LI J, JIANG ZW, YU B, TANG X. Association of two Polymorphisms of Tumor Necrosis Factor Gene with Acute Severe Pancreatitis. *J Surg Res*; 112; 138-143, 2003a.

167. ZHANG D., LI J., JIANG Z.W., YU B., TANG X., LI W. The relationship between Tumor Necrosis Factor Gene Polymorphisms and Acute Severe Pancreatitis. *Chin Med J*; 116(11): 1179-1781, 2003b.

168. ZHANG D., ZHENG H.M., YU B.J., JIANG Z.W., LI J.S. Association of Polymorphisms of IL and CD14 genes with Acute Severe Pancreatitis and septic shock. *World J Gastroenterol*; 11(28); 4409 -4413, 2005.

169. Tópicos Seleccionados de História da Medicina e Linguagem Médica. *Artigos, notas e comentários.* J M Rezende (<http://usuarios.cultura.com.br/jmrezende/>)\_30.05.2007.

# APÊNDICE

## PÂNCREAS

Pâncreas é uma palavra formada dos elementos gregos *pan* (todo) + *kréas*, carne (todo carne). Galeno, no século II DC, acrescentou um segundo nome ao pâncreas, o de *kallikréas*, que em grego, quer dizer bela carne (de *kallós*, belo + *kréas*, carne). Esta denominação perdurou em latim ao lado de *pâncreas* e sobreviveu no termo *calicreína*, substância que se acreditava fosse produzida no pâncreas. Contudo, o termo pâncreas, fora empregado por Aristóteles, que viveu de 384 a 322 A.C., e, assim, pode ter sido anterior a Herophilus. Foi descrito por Herophilus (300 AC), médico de Alexandria, considerado o *Pai da Anatomia*.

O pâncreas é uma glândula de mais ou menos 15 cm de comprimento e de formato triangular, localizada transversalmente sobre a parede posterior do abdome, na alça formada pelo duodeno, sob o estômago (Fig. 1). O pâncreas é formado por uma cabeça que se encaixa no quadro duodenal, um corpo e uma cauda afilada.

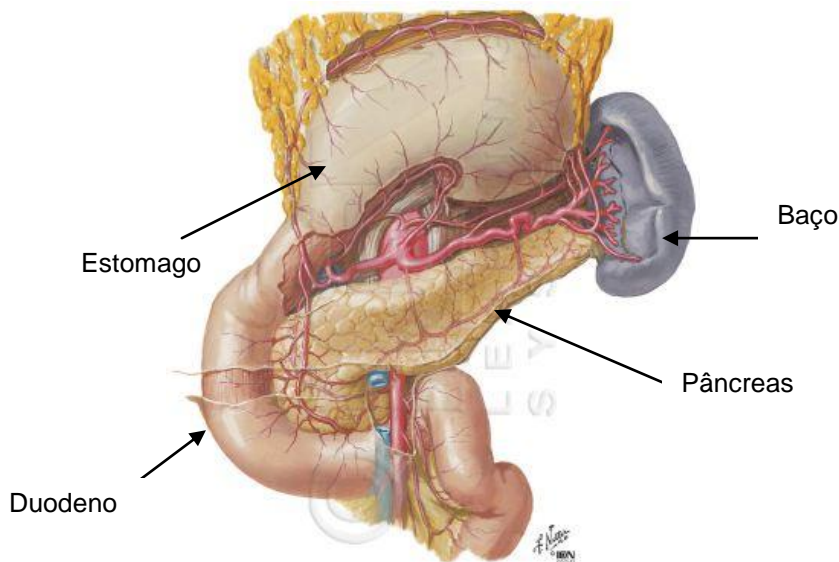


Figura 1: Localização do pâncreas

( <http://www.netterimages.com/image/3501.htm> )

A secreção externa dele é dirigida para o duodeno pelos canais de Wirsung e de Santorini. O canal de Wirsung desemboca ao lado do canal colédoco na ampola de Vater. Possui rica circulação que deriva de ramos das

artérias celíaca e mesentérica superior, e a drenagem venosa flui toda para o sistema porta.



Figura 2: Pâncreas

( [www.corpohumano.hpg.ig.com.br/.../pancreas.html](http://www.corpohumano.hpg.ig.com.br/.../pancreas.html) )

O pâncreas é uma glândula mista com uma porção endócrina e uma exócrina. A porção endócrina do pâncreas é responsável pela produção de insulina e a exócrina, pelas enzimas e proenzimas digestivas, como tripsinogênio, quimiotripsinogênio, carboxipeptidase, desoxirribonuclease, ribonuclease, triacilglicerol-lipase, fosfolipase, elastase e amilase. Essa secreção exócrina enzimática desempenha função preponderante nos processos digestivos. Todas as enzimas proteolíticas e algumas lipolíticas são secretadas na forma inativa de proenzimas, e para que exerçam sua ação sobre os alimentos, desdobrando-os, necessitam ser previamente ativadas. Em condições normais, são imediatamente transformadas em fermentos ativos após alcançarem o duodeno, pela enteroquinase. Esta última enzima, em presença de sais de cálcio, transforma o tripsinogênio em tripsina e esta, a seguir, autocataliticamente transforma as outras proenzimas em fermentos ativos.

A presença de sais de cálcio é indispensável no mecanismo desta ativação, visto que, na sua ausência, o tripsinogênio se transforma em proteína inerte, desprovida de ação enzimática. As demais enzimas lipolíticas, como a lipase e a amilase, já são produzidas na forma ativa. A quase totalidade dos nutrientes da alimentação humana é representada por proteínas, gorduras e hidratos de carbono.



Embora pequena quantidade desses alimentos possa ser absorvida sem hidrólise prévia, a grande maioria necessita ser desdobrada em moléculas menores, como polipeptídios, aminoácidos, mono e diglicérides, ácidos graxos e monossacarídeos, para serem aproveitados pelo epitélio intestinal.

Os componentes exócrinos consistem primariamente de grupos de células acinares, chamados ácidos. Esses ácidos drenam as enzimas digestivas para o duodeno através dos ductos pancreáticos.

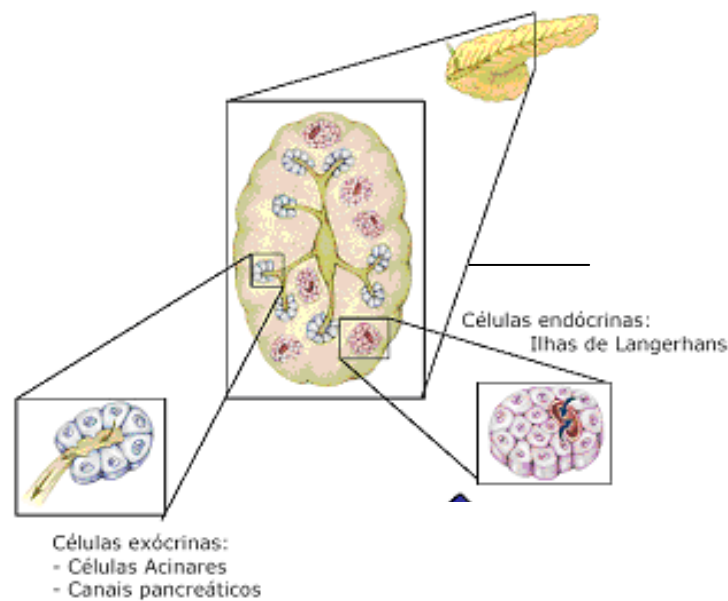


Figura 3: Estrutura endógena e exógena do pâncreas (adaptado de <http://pathology2.jhu.edu/pancreas/pancpart.cfm>)

As células estelares pancreáticas (CEP) estão presentes no espaço periacinar e possuem longos processos citoplasmáticos que envolvem a base dos ácidos. Podem ser encontradas em regiões perivascular e periductal do pâncreas. Expressam a desmina, proteína do citoesqueleto; e estocam vitamina A, guardando semelhança com as células estelares do fígado. Elas estão presentes no pâncreas normal na forma quiescente e são ativadas em processos patogênicos (PHILLIPS *et al.*, 2003; OMARY *et al.*, 2007).

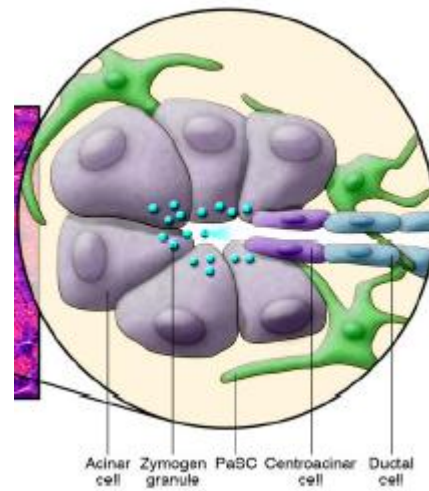


Figura 4: Ácino e células estelares pancreáticas

Estudos em cultura têm identificado numerosos fatores de crescimento, citocinas, hormônios, moléculas de sinalização intracelular e fatores regulatórios da ativação das CEP. São eles: citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, e TNF- $\alpha$ ), fatores crescimento (PDGF e TGF- $\beta$ ), angiotensina II e espécies reativas de oxigênio liberadas pelas células vizinhas e leucócitos recrutados em resposta ao dano pancreático.

# **ANEXOS**

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**ESTUDO DO POLIMORFISMO DE GENES DAS CITOCINAS (TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 E TNF- $\alpha$ ) EM INDIVÍDUOS COM PANCREATITE.**

EU, \_\_\_\_\_ fui

convidado (a) pelo(a) Dr(a). \_\_\_\_\_ médico com registro nº \_\_\_\_\_, membro da equipe de Pesquisa do Serviço de Gastroenterologia e Hepatologia do HUPES, do Hospital São Rafael, do Hospital Aliança a participar de um projeto sobre a importância dos exames de laboratório nas Pancreatites Agudas.

O objetivo do projeto é identificar a variação em material genético (DNA), na produção de citocinas, substâncias envolvidas na inflamação, que indiquem uma predisposição genética (transmitida de pais para filhos) para a minha condição clínica e o envolvimento na determinação dos problemas orgânicos, e que podem estar relacionadas com a evolução da minha doença. Essa predisposição não é o único fator determinante de minha doença, nem o mais importante; nem determina isoladamente riscos de transmitir a condição aos meus descendentes.

Durante a pesquisa um membro da equipe coletará dados pessoais meus, a história da doença e amostra de sangue para realização de exames genéticos. A retirada de sangue da veia será feita com material inteiramente descartável e poderá causar dor de fraca intensidade ou pequeno hematoma que é geralmente absorvido depois, sem problemas. O material de DNA extraído será utilizado EXCLUSIVAMENTE para fins de pesquisa clínica, sendo identificado apenas por um código, NÃO podendo ser empregado em pesquisas de paternidade ou outros fins relacionados com reprodução humana.

Terei o direito de saber os resultados desta pesquisa, os quais somente serão divulgados em revistas científicas nacionais ou internacionais, documentos de trabalhos, relatórios, congressos científicos, etc., mas a Equipe Médica garantiu-me que jamais poderei ser identificado(a), como participante desta pesquisa. Ou seja, os dados serão publicados na revista médica SEM constar o meu nome (ou as iniciais do meu nome ou o meu endereço).

Caso não queira participar, não terei nenhum prejuízo. Se aceitar, caso tenha alguma dúvida, ela poderá ser esclarecida pessoalmente no Hospital Prof. Edgard Santos, Salvador - Bahia, onde os pesquisadores podem ser encontrados. ou pelo telefone 71-99842981 em ligação a cobrar.

Assim considero-me satisfeito (a) com as explicações dadas concordo em participar como voluntário (a) deste estudo. Como tenho dificuldade para ler SIM ( ) NAO ( ), atesto que a autora e/ou membro da equipe leu esse documento e esclareceu as minhas dúvidas e como tem a minha concordância para participar do estudo coloquei a minha assinatura (ou impressão digital).

Salvador (BA) \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_

Assinatura do paciente: \_\_\_\_\_

Impressão datiloscópica (quando se aplicar)

Testemunhas:

1. Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura

2. Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura

**“TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E PRÉ-ESCLARECIDO”  
Estudo do papel de citocinas em pacientes com pancreatite crônica**

Você está sendo convidado(a) a participar voluntariamente de um estudo que tem como objetivo avaliar o papel de citocinas em pacientes com Pancreatite crônica. Antes de concordar em participar desta pesquisa é importante que você leia este documento.

Eu, \_\_\_\_\_, fui procurado(a) por \_\_\_\_\_ sobre o Projeto de pesquisa com o título acima citado, coordenado pelo Dr Jorge Guedes.

Você estará ajudando no estudo sobre o papel de citocinas em Pacientes com Pancreatite crônica, permitindo benefícios futuros para si próprio e para outras pessoas no futuro. Você poderá sair deste estudo a qualquer momento, caso decida. Os investigadores não estarão sendo remunerados para realização deste estudo, assim como os pacientes voluntários não receberão benefícios financeiros para sua participação no mesmo.

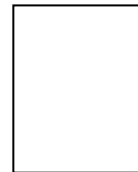
*Declaro que minha participação no estudo é voluntária e que estarei contribuindo para o melhor entendimento da minha doença. Estou esclarecido de que minha recusa em participar do estudo ou a minha desistência no curso do mesmo não afetará a qualidade e a disponibilidade da assistência médica que me será prestada.*

*Qualquer dúvida ou complicação que me ocorra no transcurso deste estudo, poderei contactar com a Dr Jorge Guedes pelo telefone (71) 9968-1364 , ou o Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa, pelo telefone (71) 203- 2740, ou no Ambulatório Magalhães Neto.*

Como tenho dificuldade para ler (  sim OU  não), atesto que a autora e/ou membro da equipe leu esse documento e esclareceu as minhas dúvidas e como tem a minha concordância para participar do estudo coloquei a minha assinatura (ou impressão digital).

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome do participante e RG



\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante ou representante legal

Polegar do participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura do investigador