



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



KÍVIA VANESSA GOMES FALCÃO

**ZEBRAFISH (*Danio rerio*) COMO NOVO MODELO PARA PANCREATITE AGUDA
INDUZIDA POR CAERULEINA**

RECIFE
2023

KÍVIA VANESSA GOMES FALCÃO

**ZEBRAFISH (*Danio rerio*) COMO NOVO MODELO PARA PANCREATITE AGUDA
INDUZIDA POR CAERULEINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Sistemas Biológicos

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Sousa Bezerra
Co-orientador: Prof. Dr. Rafael David Souto de Azevedo
Co-orientadora: Prof. Dra. Luiza Rayanna Amorim de Lima

RECIFE
2023

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Falcão, Kívia Vanessa Gomes.

Zebrafish (*Danio rerio*) como novo modelo para pancreatite aguda induzida por caeruleína. / Kívia Vanessa Gomes Falcão. – 2023.

130 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Ranilson de Sousa Bezerra.

Coorientador: Rafael David Souto de Azevedo.

Coorientadora: Luiza Rayanna Amorim de Lima.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências biológicas, Recife, 2023 .

Inclui referências.

1. Pancreatite aguda. 2. Zebrafish. 3. Inflamação. 4. Caeruleína. 5. Terpenoides. I. Bezerra, Ranilson de Sousa. (orient.). II. Azevedo, Rafael David Souto de. III. Lima, Luiza Rayanna Amorim de. IV. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-056

KÍVIA VANESSA GOMES FALCÃO

**ZEBRAFISH (*Danio rerio*) COMO NOVO MODELO PARA PANCREATITE AGUDA
INDUZIDA POR CAERULEINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 14/02/2023

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra (UFPE – CB) – Presidente

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior (UFPE – CB) – Membro Interno

Profa Dra. Ana Lúcia Figueredo Porto (UFPE – CB) – Membro Interno

Prof Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral (UFPB – CBiotec) – Membro Externo

Profa. Dra. Ana Paula Fernandes da Silva (UFPE) – Membro Externo

Dedico esse trabalho aos meus pais que amo, Miriam Falcão e Ambrosio Falcão.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar inicio meus agradecimentos a Deus por me permitir chegar até aqui! Agradeço por ter me mantido na trilha certa durante este projeto de pesquisa com saúde e pela força dada para chegar até o final. Deus, obrigada pelos teus planos para a minha vida serem sempre maiores do que os meus sonhos!

Quando entrei no doutorado já sabia que não seria flores e que surgiriam pedras que precisaria atravessá-las para poder seguir em frente. Antes de iniciar os experimentos, fiz muitos planos e já tinha traçado todas as atividades que seriam realizadas ao longo dos quatro anos. Não previa que 2020 seria marcado pela pandemia que mudaria o destino de todos. O Coronavírus chegou arrebatando todas as nossas certezas, colocou à prova a nossa fé, nos lembrou que mesmo em tempos de individualismo “estamos todos no mesmo barco”. Apesar de todas as adversidades que apareceram, conseguir terminar tudo com êxito.

Aos meus amados pais Miriam Falcão e Ambrosio Falcão, agradeço por tudo que fizeram e ainda fazem por mim. Durante essa caminhada, não foram apenas pais, mas amigos e companheiros, que compartilharam meu cansaço, os feriados e finais de semana no laboratório, as longas madrugadas de estudo e me incentivaram a prosseguir. Por mais que use todas as palavras existentes no dicionário para agradecer-lhes, sinto que ainda estaria em dívida com vocês. Vocês são uma bênção de Deus em minha vida. Espero que um dia os meus filhos possam sentir orgulho de mim, igual ao que sinto por vocês. Eu amo vocês!

A minha avó querida Maria do Nascimento, agradeço por todas as orações, por torcer sempre por mim e estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida. A minha irmã Amanda Falcão e ao meu cunhado Alysson Soares, agradeço a força e apoio incondicional. Obrigada por me presentear com a coisa mais linda desse mundo, minha sobrinha Maya.

Ao meu orientador, Dr. Ranilson de Souza Bezerra, mais uma vez agradeço a oportunidade concedida de poder fazer parte do Laboratório de Enzimologia (LABENZ). Lembro-me bem de quando mostrei meu projeto de doutorado o senhor não concordou logo de cara, mas depois que comecei os experimentos me deu muito apoio.

A minha coorientadora Dra. Luiza Rayanna Amorim de Lima, agradeço por ter aceitado me coorientar na época, sem nem ter me conhecido pessoalmente. Obrigada por ter embarcado no meu sonho, pela confiança depositada em mim e por toda ajuda durante os experimentos. Mesmo estando super ocupada com mil coisas para fazer, você arrumou um jeitinho para estar ao meu lado. Uma vez me falaram: Luiza é uma pessoa maravilhosa. Depois de lhe conhecer eu pude ter certeza disso, hoje sou eu que digo: Luiza você é uma pessoa maravilhosa!

Ao meu coorientador Dr. Rafael David Souto de Azevedo, quero agradecer o companheirismo de sempre. Você foi a primeira pessoa que conheci do Labenz na seleção para iniciação científica em 2014, quem diria que você se tornaria meu amigo e um dos responsáveis por eu ter chegado até aqui. Faltam palavras para expressar minha gratidão por tudo que você fez por mim. Depois de conhecer você eu sei que nem todos os anjos têm asas e que nem todas as estrelas estão brilhando no céu, às vezes apenas estão aqui na terra para nos proteger e iluminar os nossos caminhos. Quero lhe agradecer por isso e muito mais, por ser essa pessoa tão especial na minha vida.

Agradeço a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento que obtive durante o doutorado.

Sou grata a UFPE por passar esses oito anos da minha vida onde aprendi muito, agradeço a todo corpo docente, à direção e administração dessa instituição.

Por fim, quero agradecer a todos que cruzaram meu caminho e me ajudaram, mesmo que fosse com um simples sorriso, fizeram minha caminhada ser diferente.

“Aqueles que continuam tentando, sem desistir, são os que conseguem.”
(Kim Seok-jin, Break the silence, 2020).

RESUMO

A pancreatite aguda (PA) é um processo inflamatório grave do pâncreas que apresenta crescente aumento no número de casos e com taxa de mortalidade em casos graves que pode chegar até 17%. Por não possuir nenhum tratamento específico para a doença, nos últimos cinco anos foi observado uma demanda de pesquisas que se concentraram principalmente na busca por novas estratégias terapêuticas. Os modelos experimentais de PA usualmente são roedores, contudo apresentam respostas fisiológicas divergentes entre si, após o estabelecimento da PA. Dessa forma, é imprescindível estudar o comportamento e evolução da PA em modelos animais alternativos como o zebrafish, que se destacou como modelo experimental para uma miríade de áreas do conhecimento. Os experimentos realizados objetivaram padronizar um novo modelo de PA em zebrafish e validá-lo. Para isso, o decapeptídeo caeruleína foi testado para avaliar a capacidade de indução da PA no zebrafish. A dose administrada de caeruleína para a indução da PA foi de 10 µg/mL aplicada 4 vezes na região intraperitoneal. Como resultado, foi observado alterações histológicas com presença da necrose já nas primeiras 12h pós injeção, acompanhada de excesso de grânulos de zimogênio no meio extracelular. A quantidade sérica de amilase, lipase e proteínas totais do zebrafish, nos grupos tratados com caeruleína, aumentaram expressivamente obtendo a lipase aumento (aproximadamente 30x) da atividade enzimática no sangue já nas primeiras 12 h, mantendo-se constante até a 168 h. Em síntese, é possível afirmar que o zebrafish é um modelo animal eficaz para estudos de PA.

Palavras-chave: Pancreatite aguda. Zebrafish. Inflamação. Caeruleína.

ABSTRACT

Acute pancreatitis (AP) is a severe inflammatory process of the pancreas that shows an increasing number of cases and a mortality rate in severe cases that can reach 17%. As there is no specific treatment for the disease, in the last five years there has been a demand for research that has focused mainly on the search for new therapeutic strategies. The experimental models of AP are usually rodents, however they present different physiological responses among themselves, after the establishment of the AP. Thus, it is essential to study the behavior and evolution of AP in alternative animal models such as zebrafish, which stood out as an experimental model for a myriad of areas of knowledge. The experiments carried out aimed to standardize a new AP model in zebrafish and validate it. For this, the caerulein decapeptide was tested to assess the ability to induce BP in zebrafish. The administered dose of caerulein for BP induction was 10 µg/mL applied 4 times in the intraperitoneal region. As a result, histological changes were observed with the presence of necrosis in the first 12 hours after injection, accompanied by excess zymogen granules in the extracellular medium. The serum amount of amylase, lipase and total zebrafish proteins, in the groups treated with caerulein, increased significantly, obtaining a lipase increase (approximately 30x) in the enzyme content in the blood in the first 12 h, remaining constant until 168 h. In summary, it is possible to state that the zebrafish is an effective animal model for AP studies.

Key-words: Acute pancreatitis. Zebrafish. Inflammation. Caerulein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Principais relações anatômicas do pâncreas	17
FIGURA 2 - Ilhota pancreática humana mostrando os quatro tipos de células endócrinas	19
FIGURA 3 - Ácinos pancreático humano mostrando os tipos de células exócrinas	20
FIGURA 4 - Secreção enzimática digestiva regulada dos ácinos pancreáticos	21
FIGURA 5 - Foto do <i>Litorea caerulea</i>	35
FIGURA 6 - Semelhança estrutural da caeruleína com os hormônios CCK e Gastrina	36
FIGURA 7 - Foto do <i>Danio rerio</i>	37
FIGURA 8 - Foto embriões do <i>Danio rerio</i> com 2 horas após a fertilização	38
FIGURA 9 - Histologia do pâncreas do zebrafish	43
ARTIGO 1	
FIGURE 1 - PRISMA Flow Diagram	51
FIGURE 2 - Map of the world of AP-oriented publications distributed by continent and the respective countries publishing in the period 2016-2020	53
FIGURE 3 - Map of the world with respect to AP-oriented publications distributed by journal in the period 2016-2020.	55
FIGURE 4 - Map of the world with respect to citations distributed by journal on continents in the period 2016-2020	56
ARTIGO 2	
FIGURA 1 - Ilustração do local para aplicação da injeção intraperitoneal no zebrafish	74
FIGURA 2 - Ilustração do local para coleta sanguínea no zebrafish	76
FIGURA 3 - Gráficos dos níveis séricos de lipase, amilase e proteínas totais do zebrafish após a indução da PA com caeruleína	79
FIGURA 4 - Microscopia ótica de alterações histológicas do pâncreas do zebrafish no curso de tempo induzidas por ceruleína	81
FIGURA 5 - GRAPHICAL ABSTRACT	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Secreção enzimática de ácinos pancreáticos 24

ARTIGO 1

TABLE 1 – Overview of the dataset used, divided into five years 52

TABLE 2 – Topics present in selected articles on AP period 2016 – 2020 54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	PÂNCREAS	17
3.1.1	Anatomia do pâncreas	17
3.1.2	Pâncreas endócrino	18
3.1.3	Pâncreas exócrino	19
3.1.3.1	Secreções exócrinas	21
3.1.3.2.1	Inervação	21
3.1.3.2.2	Secreção enzimática	23
3.1.4	Doenças inflamatórias do pâncreas	25
3.2	PANCREATITE AGUDA.....	25
3.2.1	Epidemiologia	28
3.2.2	Etiologia	29
3.2.3	Patogenese	31
3.2.4	Diagnóstico e manejo clínico	32
3.2.5	Modelos animais para indução da PA	33
3.2.6	Mecanismos de indução da PA	34
3.3	CAERULEÍNA	35
3.3.1	Estrutura	36
3.3.2	Mecanismo de ação da caeruleína	37
3.3.3	Indução da PA por caeruleína	38
3.4	ZEBRAFISH	39
3.4.1	Fisiologia	41
3.4.1.1	Pâncreas do zebrafish	42
3.4.2	Zebrafish como modelo biológico	44
4	RESULTADOS	45
4.1	ARTIGO 1: GLOBAL ANALYSIS TO ACUTE PANCREATITIS: A SYSTEMATIC REVIEW	47

4.2	ARTIGO 2: A RAPID PROTOCOL TO ACUTE PANCREATITIS	
	INDUCTION IN ZEBRAFISH MODEL	64
5	CONCLUSÕES	96
6	SÚMULA CURRICULAR	97
7	REFERÊNCIAS	99
8	ANEXOS	130
8.1	Aprovações do comitê de ética	130

1 INTRODUÇÃO

A Pancreatite aguda (PA) é um distúrbio inflamatório do pâncreas que está associado a morbidade e mortalidade. Nas fases iniciais da doença ocorre a liberação e ativação de enzimas no tecido pancreático, levando a sua autodigestão. As proteases além de decompor o tecido pancreático também são responsáveis por ativar vias de sinalização encarregadas em desencadear edema, danos vasculares, hemorragia e necrose gordurosa (Bhatia et al., 2005; Zhang, Zhang et al., 2014). A etiologia da PA é variada, as principais causas identificadas são: obstrução ductal pancreática relacionada a colelitíase (Völzke et al., 2005), uso abusivo de álcool (Banerjee e Yachimski, 2014) e hipertrigliciremia (HTG) (Mosztbacher, Hanák et al., 2020).

A PA é considerada uma das doenças mais comuns na internação hospitalar por distúrbios gastrointestinais com 34 casos para 100.000 pessoas por ano em todo o mundo (Zheng, Ding et al., 2021). A PA tem sido alvo de discussões sobre o entendimento da fisiopatologia e sobre o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Apesar dos avanços tecnológicos em seu estudo, a PA permanece como um desafio, especialmente quando se considera opções de tratamento e/ou os mecanismos envolvidos em sua fisiopatologia. Deste modo, a elucidação parcial ou total das vias fisiológicas envolvidas na emergência da patologia pode constituir-se uma chave para um tratamento mais eficaz, principalmente em relação as formas mais graves da fisiopatologia que podem levar ao óbito (Gorelick e Lerch, 2017).

Embora não tenha sido completamente elucidada, a compreensão atual da fisiopatologia da PA se dá através de estudos de coorte de base populacional e revisões sistemáticas da literatura (Petrov e Yadav 2019) e ensaios experimentais usando modelos animais para indução da PA por meio de peptídeos como a caeruleína (Sun, Tian et al., 2020). A caeruleína é um peptídeo ortólogo molecular ao hormônio colescitoquinina (CCK-8), ou seja, a caeruleína induz reversivelmente a PA em animais testados por hiperestimulação acinar (Lampel e Kern, 1977; Dabrowski et al., 1994). Entretanto, torna-se fundamental destacar que as vias fisiológicas envolvidas na evolução e estabelecimento da PA induzida variam entre os animais modelo utilizados. Tal aspecto já foi discutido num estudo comparativo entre camundongos e ratos, após indução da pancreatite por caeruleína (Mareninova et al., 2006).

Nos últimos anos, vários modelos animais de PA foram desenvolvidos e tem permitido aos pesquisadores estudar sua patogênese. São eles coelhos, gatos, cães, suínos e gambás, entretanto, a maioria dos trabalhos ainda utiliza roedores (Hirano et al., 1991; Lerch et al., 1992). Neste sentido, ainda há carência de informações para esta condição fisiopatológica advinda de modelos animais alternativos como o zebrafish. O *Danio rerio* conhecido popularmente como zebrafish adquiriu bastante relevância em diversas pesquisas biomédicas, (Rosa, Figueiredo et al., 2008; Leite, Teixeira Ada et al., 2012; Nik, Croft et al., 2014). Uma das vantagens em sua utilização é que seu genoma de referência apresenta mais de 70% de similaridade com o genoma de referência humano apresentando similaridade com a anatomia e fisiologia com os órgãos humanos (Howe, Clark et al., 2013). Por ser um animal de pequeno porte, o zebrafish possui fácil manutenção e baixo custo de aquisição quando comparados aos roedores, tornando-o um excelente modelo experimental para estudos toxicológicos e fisiológicos (Kinth, Mahesh et al., 2013; Fang, Liu et al., 2014; Steele, Prykhozhiy et al., 2014).

Diante disto, o presente trabalho objetivou investigar como a caeruleína pode induzir a PA em um modelo animal alternativo e avaliar os possíveis efeitos fisiopatológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Descrever as características morfológicas e histológicas e padronizar a pancreatite aguda induzida por caeruleína utilizando o teleósteo Zebrafish como um novo modelo para fisiopatologia.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar uma análise sistemática global da produção de conhecimento sobre PA.
- Estabelecer um protocolo para indução de pancreatite aguda por meio da caeruleína no zebrafish.
- Mensurar possíveis efeitos histomorfológicos da caeruleína sobre o pâncreas do zebrafish.

- Avaliar os efeitos da pancreatite na atividade das enzimas digestivas amilase e lipase do zebrafish.

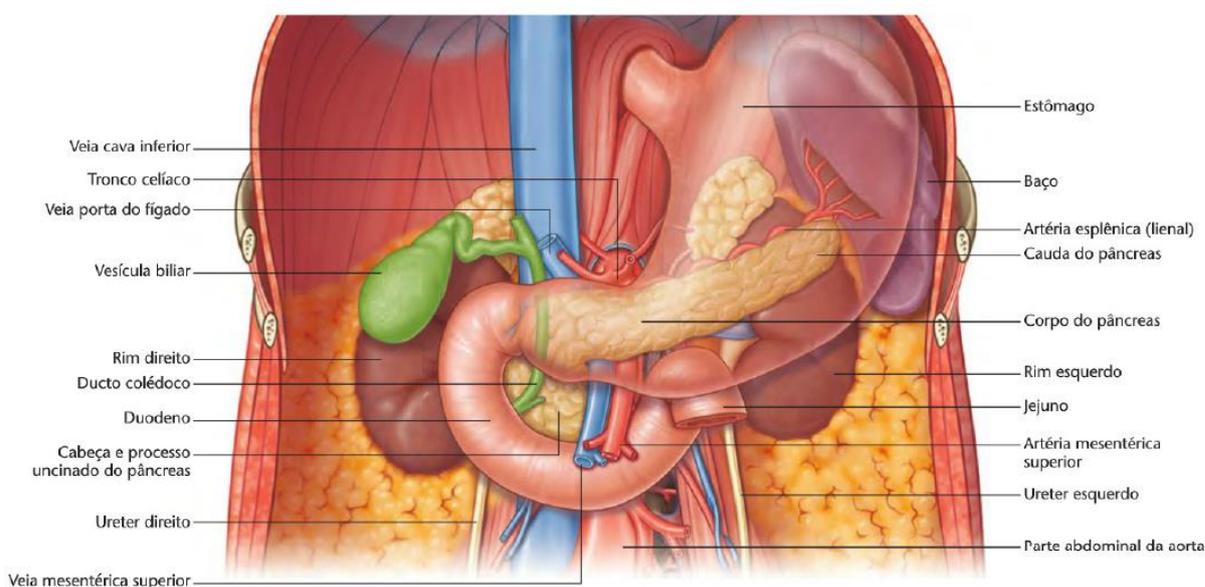
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PÂNCREAS

3.1.1 Anatomia do pâncreas

O pâncreas humano é um órgão glandular alongado derivado do endoderma, possui dimensões de 17 ± 20 cm de comprimento, 3 ± 5 cm de largura, $1,5 \pm 2,5$ cm de espessura e pesa cerca de 85 ± 117 g. Situado na região epigástrica do hipocôndrio esquerdo do peritônio, o pâncreas relaciona-se com o estômago, fígado, duodeno e o baço. Anatomicamente o pâncreas é dividido em quatro partes: cabeça, pescoço, corpo e cauda (Yuan et al., 2021). A cabeça do pâncreas situa-se aderente ao intestino, na curva C do duodeno na altura da vértebra L1. O pescoço compreende uma parte estreita entre a cabeça e o corpo, a superfície anterior do pescoço é adjacente ao piloro do estômago. O corpo representa a maior parte do tamanho total do pâncreas, com aparência cilíndrica e ligeiramente convexa o corpo anteriormente relaciona-se com o estômago e posteriormente está associado a glândula suprarrenal esquerda, rim esquerdo, vasos renais e veia esplênica (Figura 1). Na extremidade esquerda do pâncreas localiza-se a cauda, mais precisamente no hilo esplênico (Sakhneny, Khalifa-Malka et al., 2019; Yuan et al., 2021).

Figura 1 – Principais relações anatômicas do pâncreas.



Fonte: Drake (2005).

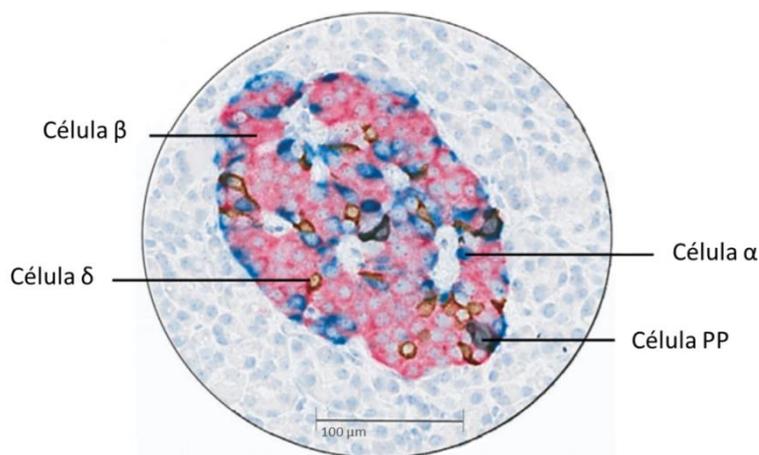
Macroscopicamente, o pâncreas possui aspecto rosa-amarelado e consistência macia a firme, externamente é circundado por uma cápsula fibrosa de tecido conjuntivo que divide seu parênquima em lóbulos. Os lóbulos compreendem os alvéolos, células exócrinas que secretam enzimas. Dispostas entre os alvéolos estão as ilhotas de Langerhans, células endócrinas secretoras de hormônios (Field, Dong et al., 2003; Saisho, Butler et al., 2007; Ellis, 2007; In't Veld e Marichal 2010). Internamente o pâncreas é constituído por um sistema interno de ductos compostos pelo ducto pancreático principal e o ducto acessório. O ducto pancreático principal possui 13,8 cm de comprimento e se inicia na cauda do pâncreas, percorre todo parênquima pancreático e na cabeça do pâncreas se junta ao ducto colédoco para formar a ampola hepatopancreática também conhecido como ampola de Vater, que se abre na parte descendente do duodeno, na papila maior do duodeno (Yuan et al., 2021).

O pâncreas é inervado através do sistema nervoso autônomo (SNA) de forma involuntária. Sua inervação parassimpática se dá através do nervo vago, ao passo que as fibras simpáticas são oriundas do plexo celíacos e plexo mesentérico superior. As fibras parassimpáticas são responsáveis pela ativação de células exócrinas e liberação do suco pancreático e hormônios (insulina e glucagon), enquanto as fibras simpáticas realizam o trabalho oposto, inibindo a via exócrina e estimulando a liberação do glucagon (Yuan et al., 2021).

3.1.2 Pâncreas endócrino

As ilhotas de Langerhans somam 2% do tecido pancreático. No adulto, o pâncreas contém cerca de 1 milhão de ilhotas que são formadas por um conjunto de células glandulares distribuídas de forma intercalada entre os ácinos no parênquima pancreático (Yuan et al., 2021). As ilhotas de Langerhans são constituídas pelas células alfa (α), células beta (β), células delta (δ) e células PP (Figura 2), juntas desempenham a função endócrina do pâncreas produzindo glucagon, insulina e amilina, somatostatina, polipeptídeo pancreático e grelina, respectivamente (Whitley, 2014; Veld e Marichal, 2010).

Figura 2 – Ilhota pancreática humana mostrando os quatro tipos de células endócrinas. Barra de escala, 100 μm .



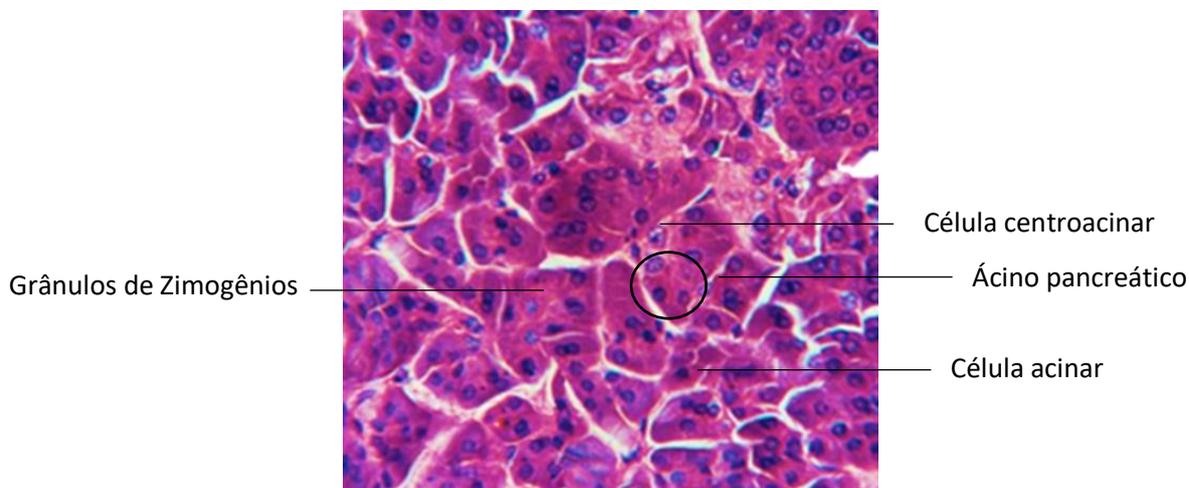
Fonte: Atkinson et al., 2020 (Adaptado).

3.1.3 Pâncreas exócrino

As células exócrinas são constituídas por um aglomerado de células em forma de cacho de uva e correspondem ao maior percentual populacional no órgão, representando 84% do pâncreas (Leung et al., 2010). A regulação do metabolismo e secreção dos ácinos é realizada por alguns hormônios endócrinos produzidos nas ilhotas pancreáticas como a somatostatina, glucagon, polipeptídeo pancreático (PP) e grelina. Além desses outros hormônios também possuem ação a nível dos ácinos pancreáticos, como por exemplo a colecistocinina (CCK) e secretina (Yuan et al., 2021). O pâncreas exócrino ainda exerce um papel importante na absorção da cobalamina, produzindo um fator intrínseco indispensável para sua absorção no intestino (Jubb e Stent, 2016).

A célula acinar possui morfologia poligonal ou piramidal, com o vértice direcionado para a luz do ácino (Figura 3). Detém o núcleo esférico localizado na base e o citoplasma contém abundantes vesículas endoplasmáticas. As vesículas contêm grânulos acidófilos chamados de zimogênios, precursores de enzimas digestivas que são acondicionados pelo complexo de Golgi, que serão liberadas na luz dos ácinos. A secreção dos zimogênios é regulada por hormônios e neurotransmissores os quais se ligam a receptores presentes na membrana basolateral das células acinares. Os zimogênios em condição normal do pâncreas são ativados apenas no lúmen do intestino delgado, após a sua secreção (Sastre et al., 2005).

Figura 3 – Ácinos pancreático humano mostrando os tipos de células exócrinas. Barra de escala, 100 μm . Uma estrutura acinar exemplar delineada com círculo, células acinares com grânulos de zimogênio localizados apicalmente e células centroacinares. Seção corada com hematoxilina e eosina (H&E) de um pâncreas humano normal.



Fonte: Ruggenti et al. (2008) (Adaptado).

Cada ácino se conecta a um ducto intercalado por meio das células centroacinares. As células centroacinares estão localizadas em direção à luz do ácino, no início dos dutos intercalares. Essas células secretam um fluido alcalino rico em bicarbonato. Os ductos são constituídos por células ductais que formam uma camada ao longo de uma membrana basal que inicia no ácino e são circundados pelo estroma retículo-vascular e sua quantidade varia dependendo do calibre do ducto (Leung et al., 2010). As células ductais assumem um papel importante no funcionamento normal da digestão e para garantir a integridade da mucosa duodenal. A sua principal função é a secreção de o bicarbonato (HCO_3^-) na concentração de 140 mmol/L que pode aumentar com a taxa de secreção. A principal função fisiológica do HCO_3^- é proteger a mucosa intestinal do ácido gástrico presente no quimo e proporcionar um pH ideal para ação das enzimas pancreáticas continuar o processo de digestão, já que algumas enzimas necessitam do pH alcalino para realizar sua ação no duodeno, um exemplo é a lipase pancreática (pH 8,1) (Liao et al., 1984). As células dos ductos intercalados e intralobulares são as principais produtoras de HCO_3^- e a sua secreção é regulada pela secretina, um peptídeo secretado pelas células D do intestino em resposta a acidez presente no quimo. Além do HCO_3^- , o fluido ductal também sofre ação de íons secretados por canais presentes na membrana celular. O outro íon negativo presente é o Cl_2 , que sua concentração varia de acordo com a concentração

de HCO^{-3} , e os outros íons presentes no pâncreas são Na, K, Ca^{2+} , e suas concentrações no líquido pancreático é similar a encontrada no plasma (Leung, 2010; Yuan, 2021).

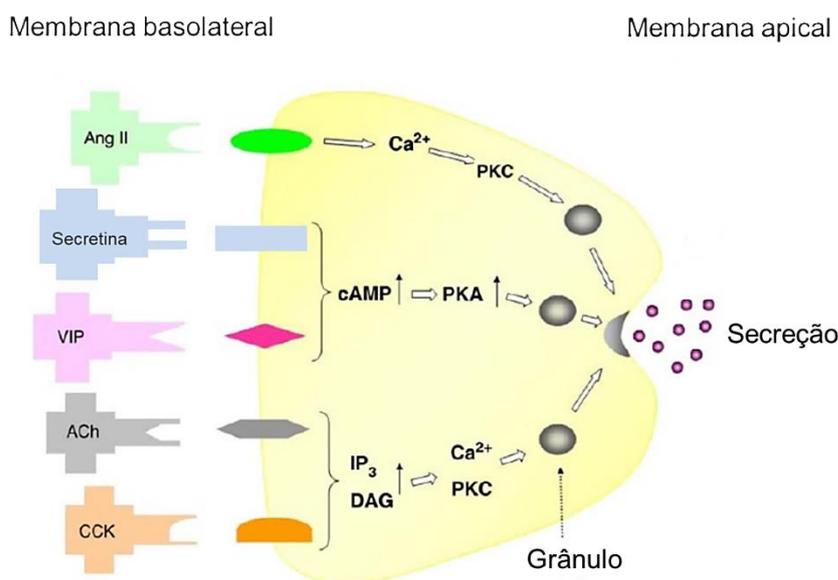
O suco pancreático é um líquido formado pela união do produto secretado pelos ácinos junto com as secreções das células ductais e centroacinares. O suco pancreático é alcalino, incolor e inodoro com pH que varia de 7,8 a 8,4 e seus principais componentes são zimogênios, enzimas digestivas e bicarbonato. Os zimogênios são precursores de enzimas inativas ou pró-enzimas, ou seja, são enzimas proteolíticas inativas que serão convertidas por reações bioquímicas em sua forma ativa (Atkinson et al., 2020; Yuan et al., 2021). As enzimas digestivas atuam na digestão dos alimentos, elas clivam macromoléculas de açúcar, proteínas e lipídeos em moléculas menores.

3.1.3.2 Secreções exócrinas

3.1.3.2.1 Inervação

A modulação da secreção exócrina do pâncreas é realizada por mecanismos neuronais, hormonais e parácrinos em resposta a ingestão de alimentos. Os principais moduladores incluem a acetilcolina (ACh), colecistocinina (CCK), e algumas moléculas parácrinas / endócrinas, como secretina, polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP em inglês *Vasoactive Intestinal Peptide*) e angiotensina II, Figura 4 (Leung, 2010). Esses secretagogos atuam em seus respectivos receptores localizados na membrana plasmática basolateral das células, desencadeando a sinalização intracelular para secreção nos ácinos.

Figura 4 – Secreção enzimática digestiva regulada dos ácinos pancreáticos. Após a estimulação de agonistas, como a colecistocinina (CCK), secretina, peptídeo intestinal vasoativo (VIP), acetilcolina (ACh) e angiotensina II (Ang II), vias de transdução de sinal são evocadas na célula acinar pancreática. ACh e CCK estimulam a secreção de células acinares pela ativação da via de sinalização de trifosfato de inositol (IP_3) / diacilglicerol (DAG), levando ao aumento do Ca^{2+} citosólico e da proteína quinase C (PKC). Secretina e VIP estimulam a secreção por meio da elevação intracelular de Monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) e, assim, ativando a proteína quinase A (PKA).



Fonte: Leung e Ip (2006) (Adaptado).

A ACh é o mais potente neurotransmissor que atua tanto nas células ductais quanto nas células acinares, secretada por terminações nervosas parassimpáticas. A ACh liga-se ao receptor muscarínico M3 presente na membrana das células glandulares exócrinas. Nos ácinos a ACh ativa o trifosfato de inositol (IP_3) uma via de sinalização de diacilglicerol (DAG) que aumenta concentração citosólica de Ca^{2+} com ativação simultânea da proteína quinase C (PKC), que por sua vez desencadeia a exocitose e secreção de vesículas contendo enzimas (Leung e Ip, 2006). Já nas células ductais a ACh é responsável pelo aumento de bicarbonato e secreção de fluido nas células (Logsdon, 2004).

A CCK é o principal peptídeo com ação no trato digestório responsável pela promoção da contração do músculo liso. A CCK influencia no fluxo de secreções pancreáticas para o intestino delgado, relaxando o esfíncter de Oddi, promovendo a contração da vesícula biliar e reduzindo o esvaziamento gástrico (Logsdon, 2004). A CCK ainda é responsável por manter o crescimento do pâncreas e estimular a síntese de novas enzimas digestivas, induzir a secreção de insulina e no sistema nervoso central está relacionada com a angiogênese, saciedade, nocicepção, memória e aprendizagem (Sekiguchi, 2016). O peptídeo CCK é produzido e secretado por células neuroendócrinas intestinais, as células I, presentes no intestino delgado, em resposta a presença de produtos hidrolíticos da digestão, incluindo aminoácidos ácidos e ácidos graxos. A CCK liga-se aos receptores da superfície: CCK1 e CCK2 (McGuckin

et al., 2020). Semelhante ao mecanismo de sinalização exercido pela ACh, a CCK também induz a secreção acinar por meio da via IP_3 /PKC dependente de Ca^{2+} . Além disso, CCK1 ativa a proteína ativada por mitogênio (MAPK) via IP_3 K e induz o acúmulo de Monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) (Sekiguchi, 2016). Em estado de jejum os níveis plasmáticos de CCK em humanos são baixos em torno de 1 pmol / litro, após a ingestão de alimentos a concentração aumenta para 6 - 8 pmol / litro em 10 a 30 min, seguido por um declínio gradual para os níveis basais mais de 3 h após a ingestão. A administração de doses elevadas de substâncias análogas a CCK produz os mesmos níveis de secreção de enzimas pancreáticas (Logsdon, 2004). O mecanismo fundamental da patologia pancreática induzida pela CCK e seus análogos baseia-se na ação desses produtos químicos em seus receptores presentes no pâncreas.

A Secretina é um hormônio peptídico liberado pelas células S da mucosa intestinal em resposta a acidez do quimo. A liberação de secretina promove a secreção subsequente de bicarbonato pancreático (Logsdon, 2004). O VIP é um neuropeptídeo endógeno com amplas funções fisiológicas, promove o relaxamento do músculo liso, inibe a secreção de ácido gástrico, propicia a secreção de muco e estimula a secreção de íons e fluidos no pâncreas (Jayawardena et al., 2017). A secretina e o VIP estimulam a via de adenilato ciclase (AC), que leva a produção da proteína quinase A (PKA). As vias quinases PKA e PKC desencadeiam a fusão dos zimogênios com a membrana plasmática apical, levando à exocitose no lúmen acinar. A angiotensina II no pâncreas ativa receptores de angiotensina I ou II presentes na membrana do ácinos e estimula a liberação enzimática por elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} e o nível de PKC, e, portanto, ativa a secreção dos grânulos (Leung, 2007; Hegyi e Petersen, 2013).

3.1.3.2.2 *Secreção enzimática*

O pâncreas exócrino é responsável pela maior taxa diária de síntese proteica de todos os órgãos do corpo, produzindo de 1000 - 1500 mL de secreção exócrina pancreática com 10 - 100 g/L de proteína que chegam ao intestino delgado todos os dias (Gorelick e Jamieson, 2012). A síntese de proteínas tem início no retículo endoplasmático rugoso (RER) das células acinares onde a maior parte das enzimas

são sintetizadas em sua forma catalítica inativa pelos ribossomos para evitar a autodigestão e lesão ao próprio pâncreas, quadro 1. O transporte vesicular de proteínas segue para o complexo de Golgi no qual passam por modificações pós-transdacionais e condensação. Durante a condensação, ocorre acidificação das proteínas por meio da atividade da V-ATPase, em seguida as etapas de maturação e embalagem formam os grânulos de zimogênio que são armazenados no pólo superior das células. A secreção ocorre por exocitose regulada em resposta a vários estímulos, tanto neuronais como hormonais e consiste no deslocamento dos grânulos em direção à membrana apical (Sastre et al., 2005; Gorelick e Jamieson, 2012).

Quadro 1 – Secreção enzimática de ácidos pancreáticos.

Enzimas e zimogênios	Ativação	Substrato	Mecanismo de ação
Tripsingênio	Enteropeptidase	Proteínas	Endopeptidase
Quimotripsogênio	Tripsina	Proteínas	Endopeptidase
Proelastase	Tripsina	Elastina	Endopeptidase
Procarboxipeptidase A	Tripsina	Proteínas	Exopeptidase
Procarboxipeptidase B	Tripsina	Proteínas	Exopeptidase
Procolipase	Não tem	Triglicerídeos	Liga a lipase aos lipídios
Lipase pancreática	Não tem	Triglicerídeos	Cliva triglicerídeos
Hidrolase de colesteril éster	Não tem	Ésteres colesterílicos	Colesterol
α -amilase pancreática	Cl	Amido	Hidrolisa o amido
Ribonuclease	N/A	RNA	Cliva RNA em nucleotídeos
Desoxirribonuclease	N/A	DNA	Cliva DNA em nucleotídeos
Profosfolipase A	Tripsina	Fosfolipídios	Cliva fosfolipídeos

Fonte: McGuckin et al (2020) (Adaptado).

A ativação dos zimogênios é iniciada apenas quando atinge o intestino por ação da enteroquinase, enzima secretada pela mucosa duodenal responsável por ativar o

tripsinogênio em tripsina proteoliticamente ativa. A tripsina por sua vez possui ação auto catalítica ativando o tripsinogênio e outros zimogênios em sua forma ativa (Washabau, 2013). A fim de evitar o risco de autodigestão acinar, o pâncreas detém de mecanismos internos que impedem a ativação precoce dos zimogênios, dentre eles estão as baixas concentrações de Ca^{+2} intracelular, baixo pH e a presença de inibidores. Neste sentido, o inibidor de tripsina pancreática é uma proteína que inibe a ação catalítica da tripsina dentro dos grânulos e é produzido e liberado pelo pâncreas juntamente com os zimogênios dentro dos grânulos (Weiss et al., 2008).

3.1.5 Doenças inflamatórias do pâncreas

Os distúrbios inflamatórios associados à disfunção das células acinares incluem a PA, pancreatite crônica (PC) e pancreatite autoimune (PAI). Dentre elas, a PA destaca-se por ser a doença pancreática mais comum na população e é o distúrbio gastrointestinal mais recorrente em internamentos hospitalares (Chatila, Bilal et al., 2019).

O termo pancreatite refere-se à condição inflamatória do pâncreas e pode ser classificada de acordo com as manifestações clínicas da doença em: aguda e crônica, ambas são caracterizadas por manifestações de náuseas; vômito, dor abdominal e elevações no nível plasmático das enzimas pancreáticas: amilase e lipase. A PA é desencadeada devido a ativação precoce de proteases dentro das células acinares, causando a autodigestão e necrose no parênquima pancreático (Bradley, 1993; da Cunha, 1994). Pacientes que apresentam PA recorrente possui alto risco de desenvolver a PC (Nøjgaard et al., 2011). A PC é uma doença progressiva caracterizada por danos irreversíveis ao pâncreas. Sua causa etiológica é multifatorial e apresenta manifestações clínicas variáveis (Singhi et al., 2014), apresentando sinais clínicos de fibrose acinar com perda significativa do parênquima pancreático, comprometimento das funções pancreáticas, exócrina e endócrina, e em seu estágio avançado evolui para o câncer (Banerjee, 2014).

A PAI é uma condição fibroinflamatória rara, mais frequente em pessoas acima de 40 anos (Imrani et al., 2021). A PAI é classificada em dois tipos, tipo I é determinada pela presença de infiltrado linfoplasmocitário periductal, já o tipo II é caracterizado por infiltrado neutrofílico que pode envolver o epitélio do ducto (Zhang et al., 2011). A PAI

possui manifestações multiorgânicas distintas incluindo níveis sorológicos aumentados para imunoglobulinas do tipo IgG4, dor epigástrica, colangite, icterícia, presença de denso infiltrado linfoplasmocitário periductal no pâncreas, fibrose pancreática, fibrose intersticial pulmonar, fibrose retroperitoneal, linfadenopatia peripancreática, nefrite tubulointersticial e pseudotumor orbital (Fujinaga et al., 2010; Imrani et al., 2021). A etiologia pode estar relacionada a outras doenças, como: doença inflamatória intestinal, síndrome de Gougerot-Sjögren, tireoidite, diabetes e fibrose retroperitoneal (Vlachou et al., 2011).

3.2 PANCREATITE AGUDA

A PA é um distúrbio gastrointestinal comuns em internamentos que causa morbidade e reduzem a expectativa de vida (Gorelick e Lerch, 2017). O tempo médio de internação dos pacientes é de 5 a 6 dias (Devani et al., 2018). A maioria dos pacientes desenvolve a forma leve da doença e aproximadamente 20% dos pacientes desenvolvem a forma da PA moderada ou grave (Boxhoorn et al., 2020).

As características clínicas da PA no estágio inicial até o estágio mais grave, respectivamente, estão listadas a seguir, nelas incluem: 1- inflamação aguda do parênquima pancreático e tecidos peripancreáticos, sem a presença de necrose tecidual, 2- inflamação associada a necrose do parênquima pancreático e / ou necrose peripancreática, 3- edema intersticial sem necrose peripancreática associada, 4- presença de pseudocisto pancreático, com presença ou ausência mínima de necrose, 5- edema intersticial e necrose associada ao parênquima pancreático e / ou os tecidos peripancreáticos, 6- necrose pancreática e / ou peripancreática que desenvolve uma parede inflamatória bem definida (Banks et al., 2013).

O curso clínico da PA é dividido em duas fases distintas: inicial e tardia, esta divisão é relacionada com a evolução e prognóstico da doença. A fase inicial, geralmente dura uma semana ou pode seguir um curso prolongado de semanas a meses, descrita pela resposta do corpo frente à lesão pancreática local. Durante a inflamação pancreática, cascatas de citocinas são ativadas e juntas geram uma resposta inflamatória inespecífica (Buter et al., 2002). A resposta inflamatória apresenta alguns sinais clínicos como: frequência cardíaca >90 batimentos/min, temperatura corporal variando <36°C ou >38°C, hemograma <4.000.000,00/mm³ ou

$>12.000.000,00/\text{mm}^3$, Respiração >20 inspirações/min ou $\text{PCO}_2 <32$ mm Hg. O principal motivo para a gravidade do quadro da PA durante a fase inicial é a duração da resposta inflamatória em determinados órgãos como rins, pulmão e coração. Quando a resposta inflamatória nos órgãos se resolve dentro de 48h a doença não evolui para o estado grave (Johnson e Abu-Hilal, 2004). Entretanto, quando a resposta inflamatória persiste e afeta mais de um órgão do sistema, é denominado síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS do inglês *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) que pode evoluir para falência de múltiplos órgãos (MOF do inglês *Multiple Organ Failure*). A duração da MOF em pacientes está associada a mortalidade na PA grave (Mofidi et al., 2006; Banks et al., 2013).

A fase tardia está associada à persistência da SIRS e suas complicações no corpo. A fase tardia geralmente acomete apenas os pacientes com PA moderada ou severa. Além do quadro inflamatório no pâncreas com presença de necrose pancreática e peripancreática, as complicações locais incluem acúmulo de fluidos peripancreáticos e as complicações sistêmicas podem estar relacionadas a exacerbações da inflamação ou de comorbidades subjacentes relacionadas ao quadro agudo da PA (Banks et al., 2013). A síndrome de angústia respiratória aguda (ARDS do inglês *Acute Respiratory Distress Syndrome*) é uma complicação da PA grave responsável por causar lesão pulmonar e promover aproximadamente 60% de todas as mortes da PA grave já na primeira semana da doença (Dombernowsky et al., 2016). A hemorragia também tem sido considerada umas das complicações do agravamento da PA, que ocorre principalmente em pacientes com necrose parenquimatosa. A hemorragia na PA é originada pela erosão de vasos sanguíneos por enzimas proteolíticas pancreáticas ou pela ruptura de pseudoaneurismas arteriais relacionados a PA. As complicações hemorrágicas na PA dependem do local do sangramento e de sua gravidade, podendo evoluir ao choque hipovolêmico (Tang, Chen et al., 2018). O dano a barreira intestinal é outro episódio importante durante a progressão da PA grave (Chen et al., 2014). Citocinas como o Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) liberadas durante o curso da PA são responsáveis por danificar a barreira intestinal, levando a um aumento da permeabilidade intestinal e translocação de bactérias resultante do lúmen intestinal para órgãos distantes (Deitch, 1990; Brenchley e Douek, 2012). Esse fato é responsável pela forma mais nociva da inflamação sistêmica resultando em danos a órgãos distantes (Barbeiro, Koike et al., 2016). O envolvimento

renal é relevante na PA grave, a lesão renal após a PA grave é um processo complexo que envolve múltiplas mudanças patológicas como comprometimento de microcirculação, diminuição da pressão de perfusão renal devido à síndrome do compartimento abdominal, hipertensão intra-abdominal e hipovolemia além da lesão renal aguda (LRA). A LRA é identificada como um marcador de mortalidade em PA grave (Devani et al., 2018).

A PA tem sido alvo de discussões sobre o entendimento da fisiopatologia e sobre o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Apesar dos avanços tecnológicos em seu estudo, a PA permanece como um desafio, especialmente quando se considera os mecanismos envolvidos em sua fisiopatologia. Deste modo, a elucidação das vias fisiológicas constitui-se uma chave para um tratamento mais eficaz, principalmente em relação as formas mais graves da fisiopatologia que podem levar ao óbito (Gorelick e Lerch, 2017).

3.2.1 Epidemiologia

A incidência global da PA possui estimativa de 34 casos por 100.000 habitantes por ano (Xiao, et al., 2016). O número de casos de PA aumentou em mais de 20% nos últimos 20 anos, assumindo o patamar das causas mais frequentes de hospitalização mundial por doenças gastrointestinais (Bálint, Fúr et al., 2020). Atualmente ainda não se tem valores exatos da incidência da PA em todo mundo por causa da falta de estudos na área em algumas regiões do mundo, como por exemplo, na América do Sul, África, Sudeste Asiático e Leste. Entretanto, em outras regiões os dados de base populacional sobre a incidência da PA estão disponíveis, sobre eles foi identificado que as regiões da América do Norte e do Pacífico Ocidental possuem alta incidência de PA (incidência maior que 34 casos por 100.000 habitantes por ano) e a Europa possui uma baixa incidência (29 casos por 100.000 habitantes por ano) (Petrov e Yadav, 2018). O número de mortes de pacientes com PA varia de 1 a 60 mortes por 100.000 pessoas/ano (Xiao, et al., 2016), e a taxa de mortalidade para os casos graves varia de 5% a 17% (Chatila, Bilal et al., 2019).

3.2.2 Etiologia

A PA possui etiologias variadas responsáveis por desencadear vias celulares patológicas e disfunção de organelas que culminam na inflamação local, morte celular acinar e inflamação sistêmica. As principais causas identificadas são: obstrução ductal pancreática relacionada a colelitíase (Völzke et al., 2005), álcool (Banerjee e Yachimski, 2014), hipertrigliciremia (HTG) (Mosztbacher, Hanák et al. 2020), colangiopancreatografia retrógrada endoscópica (CPRE), hereditária (Mastoraki et al., 2014) e por infecções virais (Gorelick e Lerch, 2017).

A inflamação no pâncreas decorrente da obstrução por cálculo biliar é considerada uma das etiologias mais comuns da PA (Völzke et al., 2005). A passagem dos cálculos biliares causa obstrução no ducto pancreático (DP) conforme passam pelo ducto biliar comum, através da ampola de Vater. A obstrução do DP aumenta a pressão interna causando bloqueio da secreção pancreática e, conseqüentemente, ativação das enzimas pancreáticas dentro da célula acinar que leva à autodigestão do pâncreas (Vonlaufen et al., 2008).

O consumo abusivo do álcool possui efeito tóxico direto nos ácinos pancreáticos e também pode desencadear tanto a PA como a PC. Os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da patologia associada ao álcool ainda não são claros, mas estudos apontam que o álcool pode alterar o conteúdo proteico das secreções pancreáticas levando à formação de cilindros proteináceos que obstruem os ductos e geram hipertensão de pequenos ramos de ductos. E por consequência, ativam de forma prematura as enzimas dentro do pâncreas (Banerjee e Yachimski, 2014).

A HTG é uma das etiologias frequentes da AP, ficando atrás apenas das principais causas recorrentes em internamentos como cálculos biliares e consumo excessivo de álcool (Mosztbacher, Hanák et al., 2020). Decorrente do nível elevado de triglicerídeos séricos (> 1.000 mg/dL), a HTG provoca hidrólise de lipoproteínas com elevada concentração de triglicerídeos que liberam altas concentração de ácidos graxos livres, que por sua vez danificam o endotélio e as células acinares pancreáticas (Jo, Chang et al., 2019; Chatila, Bilal et al., 2019). A HTG está associada a maior gravidade da PA nos pacientes quando comparadas a outras etiologias (Zhang, Deng et al., 2019; Mosztbacher, Hanák et al., 2020) e a sua incidência é maior em pacientes

mais jovens, mostrando ainda a ocorrência de recidivas mais frequentes do que a PA por outras causas (Jo, Chang et al., 2019; Kim, Kang et al., 2020).

A PA hereditária ocorre em indivíduos ainda na idade jovem sem nenhuma patologia preexistente ou que apresente sinais clínicos de PA recorrente com histórico familiar de PA. A patologia é identificada pela ausência de uma etiologia identificável. A PA hereditária é uma doença autossômica dominante causada por mutações do exon 3 no gene da serina protease 1 (PRSS1) responsável por codificar o tripsinogênio catiônico (Banerjee e Yachimski, 2014). Várias mutações genéticas distintas foram identificadas no gene PRSS1, entretanto as mais prevalentes são as mutações R122H e N29I (Mastoraki et al., 2014). A mutação R122H interfere na autólise da tripsina, resultando em excesso de atividade da enzima; a mutação N29I resulta em alteração estrutural na molécula de tripsina que promove a redução da afinidade da enzima com seu inibidor (Banerjee e Yachimski, 2014). Os pacientes com alteração hereditária no gene PRSS1 sofrem de episódios recorrentes de PA, que progridem na maioria dos casos para PC. Além disso, ainda possuem um risco 50 vezes maior de desenvolver câncer de pâncreas (Ceppa et al., 2013). Em menor ocorrência, as mutações no gene inibidor de serina protease Kazal tipo 1 (SPINK1) também são responsáveis por causar PA, a proteína codificada pelo SPINK1 inibe a atividade da tripsina e, portanto, sua mutação serve como mutações de perda de função proteica responsável pela PA (Banerjee e Yachimski, 2014).

Algumas variantes do vírus Coxsackie grupo B (CVB) podem causar PA em humanos e animais. A variante CVB4-P causa PA com duração máxima de até 10 dias, já a variante de CVB4-V além de causar PA também pode evoluir para o quadro de PC (Gorelick e Lerch, 2017). Os camundongos infectados com os vírus coxsackie B1, B3, B4 ou B5 produziram a forma grave de PA na qual consiste em degeneração das células acinares, perda de grânulos de zimogênio, infiltração de células mononucleares e substituição de tecido exócrino por tecido adiposo (Zhan et al., 2016). A PA também pode ser causada pela CPRE, apesar de ser uma causa etiológica rara, a PA pós-CPRE é a complicação que resulta em morbidade significativa, ocorrendo em 3% a 15% dos casos de CPRE (Elmunzer, 2017).

3.2.3 Patogênese

A fisiopatologia da PA envolve uma cascata complexa de eventos, que se iniciam nos ácinos pancreáticos. Os fatores moleculares e celulares que iniciam a promoção da PA ainda não estão claros, porém estudos relatam que a PA se desenvolve em decorrência de uma lesão ou ruptura dos ácinos pancreáticos provenientes do: estresse do RE (Biczko et al., 2018), influxo exacerbado de Ca^{2+} (Petersen e Sutton, 2006) e disfunção mitocondrial (Criddle et al., 2007; Javed et al., 2018).

A função fisiológica dos ácinos pancreáticos depende significativamente de ações coordenadas do RE e do sistema lisossômico. O estresse do RE está relacionado ao acúmulo de proteínas mal dobradas ou não dobradas dentro do lúmen RE, isso ocorre quando a capacidade de sintetizar e eliminar proteínas de forma eficiente é sobrecarregada (Lee e Papachristou, 2019). Essa condição fisiológica ativa vias de transdução de sinal intracelular que visa melhorar o acúmulo de proteínas não dobradas no RE; entretanto, esses eventos induzem a morte celular via apoptose (Ron e Walter, 2007; Kim et al., 2008).

A sobrecarga de citosólica Ca^{2+} nas células acinares é um fator central responsável por iniciar a PA, produzindo diversos efeitos na célula como ativação enzimática intracelular precoce, vacuolização e necrose (Raraty et al., 2000) (Voronina et al., 2002). O Ca^{2+} é o mensageiro intracelular encarregado de controlar, regular e participar de vários processos celulares, tais como: mediar a morte celular e as vias inflamatórias, ativar vias de sinalização inicial da exocitose do zimogênio por meio da PKC, ativação do fator nuclear de transcrição pró-inflamatório- κB (NF- κB) e participação de mecanismos que estimulam a produção de ATP na mitocôndria (Lee e Papachristou, 2019).

A disfunção mitocondrial é um evento relevante na PA; visto que as mitocôndrias são extremamente importantes para o desempenho de funções vitais no organismo, como na produção de energia e ativações de vias críticas nas células que podem levar a lesão ou a morte celular. Dentre os principais fatores que podem interferir no seu funcionamento, estão o: aumento do Ca^{2+} citosólico (Petersen e Sutton, 2006), geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e escassez de oxigênio. A principal consequência da alteração da homeostase mitocondrial é a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP)

via Ciclofilina D humana (CyDh), que atua na regulação da abertura MPTP. Quando aberto, o MPTP permite a entrada desregulada de solutos na matriz celular acinar, resultando na despolarização mitocondrial e conseqüentemente na redução da síntese de ATP pela cadeia transportadora de elétrons (CTE), paralisação das bombas de Ca^{2+} dependentes de energia ocasionando sobrecarga de Ca^{2+} citosólico (Criddle et al., 2007). Uma alternativa encontrada pela CTE para compensar a perda e retomar o gradiente normal é a aceleração da sua atividade, resultando no aumento na oxidação de substratos pelo ciclo de Krebs e maior consumo de O_2 (Clapham et al., 2000; Erlanson-Albertsson, 2003), tornando esse evento um pré-requisito para desencadear a necrose celular (Petersen et al., 2021).

3.2.4 Diagnóstico e manejo clínico

O diagnóstico da PA é realizado no paciente quando este apresenta no mínimo dois dos três critérios clínicos usuais: 1- dor abdominal típica representada por dor epigástrica persistente e severa com irradiação para as costas; 2- elevação da amilase sérica e / ou elevação da lipase em três vezes o limite superior normal; 3- achados de imagem consistente com pancreatite aguda (Lee e Papachristou, 2019). Outros marcadores gerais e inespecíficos como leucócitos e proteína C reativa (PCR), também são utilizados, dentro do prazo de 24 horas após a admissão do paciente, como marcadores para avaliação da gravidade da PA (Bierma, Coffey et al., 2016; Szabo, Hornung et al., 2016).

As imagens para o diagnóstico da PA podem ser obtidas por meio de exames como endoscopia digestiva, ultrassonografia abdominal, tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética. Dependendo do exame realizado, as imagens resultantes podem refletir a anatomia, metabolismo ou aspectos moleculares do tecido de interesse (Dimastromatteo et al., 2016). Nas imagens obtidas por endossonografia da PA, por exemplo, o pâncreas possui achados variáveis e inespecíficos, assumindo um aspeto normal ou apresentar-se ligeiramente aumentado e hipoecóico devido ao edema, e com áreas focais hipoecóicas indicativas de necrose parenquimatosa. A TC é o exame de imagem mais utilizado para o diagnóstico da PA, os resultados são variáveis e pode apresentar: edema, gordura peripancreática, falta de realce no

contraste no parênquima compatível com o quadro de necrose pancreática e coleções de fluido peripancreático (Rodrigues et al., 2014).

Atualmente o manejo clínico de pacientes com AP inclui métodos não invasivos como a administração de analgésicos, antibióticos, fluidoterapia, nutrição enteral e nos casos graves de PA a CPRE e pancreatectomia (Koutroumpakis, Slivka et al., 2017; Stigliano, Sternby et al., 2017).

3.2.5 Modelos animais para indução da PA

Nos últimos 150 anos foram utilizados e determinados diversos animais para o estudo de doenças inflamatórias no pâncreas. Esses modelos ajudam a identificar a patogênese e a fisiopatologia da doença. Assim, modelos animais experimentais confiáveis e relevantes que se assemelham à doença humana são cruciais para o desenvolvimento e compreensão da patogênese. Embora os estudos *in vitro* tenham estabelecido muitas bases para compreensão bioquímica da fisiologia de órgãos digestivos, eles não replicam as complexas interações químicas, hormonais e ambientais que regulam a fisiologia do pâncreas *in vivo*. Essas limitações são superadas com o uso de um sistema animal inteiro, onde os órgãos digestivos contêm micro-organismos, enzimas, bile e muco que influenciam a fisiologia e, mais importante, o desenvolvimento de patogênese (Mareninova et al., 2006).

Nos últimos anos, os modelos animais para pancreatite têm permitido aos pesquisadores estudar etiopatogênese e fisiopatologia, são eles coelhos, cães, suínos e gambás, entretanto a maioria dos trabalhos ainda utiliza roedores (Hirano et al., 1991; Lerch et al., 1992). Os roedores são o modelo animal amplamente adotado para estudos da PA e têm sido empregados em 3.800 relatórios de pesquisa nos últimos 35 anos e citados mais de 500 vezes (Ulmasov et al., 2013). Entretanto, torna-se fundamental destacar que as vias fisiológicas envolvidas na evolução e estabelecimento da pancreatite variam entre os animais modelo utilizados (Mareninova et al., 2006). Neste sentido, ainda há carência de informações para esta condição fisiopatológica advinda de modelos animais alternativos como o zebrafish. Ou mesmo se há condições para indução experimental da pancreatite neste modelo.

3.2.6 Mecanismos de indução da PA

A PA usualmente é estudada por meio de indução, onde podem ser examinados os mecanismos de patogênese, testar intervenções terapêuticas e estudar a influência da inflamação na evolução da doença (Gorelick e Lerch, 2017). Os ensaios experimentais para indução da PA podem ser executados por diferentes metodologias: por hiperestimulação de secretagogos, peptídeos (Sun, Tian et al. 2020), aminoácidos básicos (Zhu, Huang et al., 2016), ligadura cirúrgica, infusão de ácidos biliares (Gorelick e Lerch, 2017).

A administração injeções intraperitoneais de altas concentrações de aminoácidos em modelos animais são amplamente utilizadas para induzir a PA. Os aminoácidos naturais L-arginina, L-ornitina, L-lisina e L-histidina são responsáveis por causar lesão mitocondrial, a ativação do tripsinogênio e do NF-κB (Rakonczay Jr et al., 2008; Biczó et al., 2011; Kui et al., 2014), além disso também possuem efeitos tóxicos no RE responsáveis pela elevação de Ca^{+2} citosólico (Kubisch et al., 2006). Um estudo realizado em mitocôndrias pancreáticas isoladas demonstrou que a L-lisina prejudica a capacidade da mitocôndria de restaurar o potencial elétrico de membrana e a respiração após a adição de ADP (Kui et al., 2014), dessa forma ocorre inibição da síntese de ATP. Apesar de ser uma metodologia bastante utilizada, a indução da PA por meio de injeções de aminoácidos possui resultados variados, sua fisiopatologia é incerta e sua relevância é bastante questionável em comparação a doença em humanos, principalmente pelo quadro severo de necrose pancreática causada pelos aminoácidos (Gorelick e Lerch, 2017).

A PA pode ser induzida em animais por ligadura cirúrgica do ducto biliar com o ducto pancreático ou pela introdução de ácidos biliares no ducto pancreático. Essa metodologia é aplicada para estudos que visem buscar resposta inflamatória pancreática ou agentes terapêuticos para reduzir a gravidade da doença (Gorelick e Lerch, 2017).

Uma das formas de indução da PA em roedores mais utilizada é pela hiperestimulação de secretagogos. Este método de indução traz a vantagem de ser um método menos invasivo, pois, não há necessidade de realizar cirurgia quando comparado com a PA induzida por ligadura cirúrgica do ducto biliar. Além disso, os secretagogos são fisiologicamente relevantes por mimetizar a doença humana produzindo a mesma reação no corpo e não de forma exacerbada como os

aminoácidos. Estudos realizados demonstraram que a administração intravenosa de altas concentrações do hormônio intestinal CCK (10 vezes maior do que durante a secreção enzimática), ou seu ortólogo molecular a caeruleína, induz uma forma leve e reversível da PA em ratos (Lampel e Kern, 1977).

A caeruleína quando administrada em altas doses induz descarga de lisossomos e a fusão dos lisossomos com os grânulos de zimogênio através da membrana celular basolateral dos ácinos pancreáticos. Como consequência, a caeruleína promove edema pancreático muito semelhante a forma da PA observada em pacientes clínicos (Griesbacher et al., 2006).

3.3 CAERULEÍNA

A caeruleína é um peptídeo liberado através da pele de anfíbios pertencentes a família *Hylidae*. Nos anfíbios, este peptídeo ajuda na regulação dérmica e como parte integrante do seu sistema de defesa. A secreção da caeruleína ocorre no intestino e no dorso da sua superfície externa por glândulas especializadas (Bowie, 2013). A caeruleína possui diversas funções bioativas, incluindo a função antimicrobiana, anticâncer, antiviral, antifúngico e atividade no músculo liso (Apponyi et al., 2004). A caeruleína foi isolada pela primeira vez em 1968 a partir da pele da rã australiana *Litoria caerulea* (Sekiguchi, 2016) (Figura 5).

Figura 5: Foto do *Litoria caerulea*.



Fonte: Endlein e Barnes (2015).

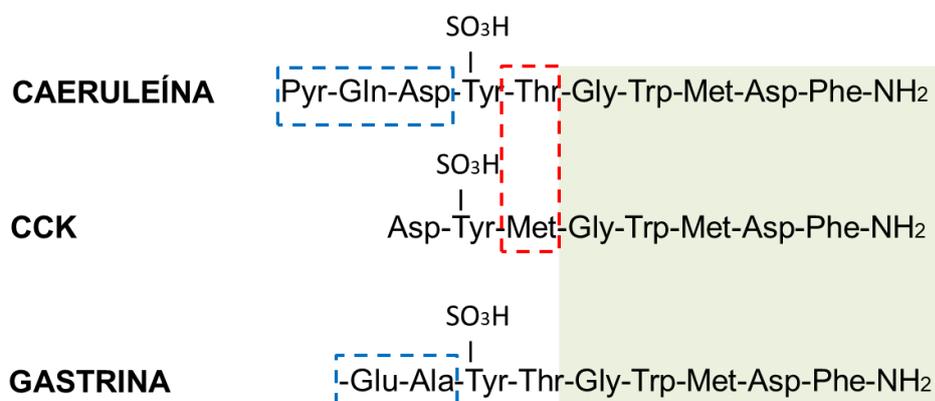
Posteriormente também foi identificadas variedades deste peptídeo em outras espécies como o *Hylids australianos*, *Leptodactylus pentadactylus labyrinthicus* e *Xenopus laevis* (De Caro et al., 1968; Anastasi et al., 1970). Nos anfíbios a caeruleína é processada e armazenada como procaeruleína inativa, quando a rã é atacada ou está doente, uma protease corta o peptídeo espaçador (preprocaerin 1.1) e a caeruleína ativa é então exsudada pela pele (Bowie, 2013).

3.3.1 Estrutura

A caeruleína é um decapeptídeo que possui a fórmula molecular $C_{58}H_{73}N_{13}O_{21}S_2$, sendo composto pela sequência de aminoácidos H-Pyr-Gln-Asp-Tyr(SO₃H)-Thr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (Anastasi et al., 1967). No terminal N está presente um resíduo de piroglutamato, em C-terminal um resíduo de fenilalanina está amidado, e no sétimo resíduo do terminal C possui uma tirosina sulfatada (Sekiguchi, 2016).

A caeruleína, gastrina e a colecistocinina compartilham a semelhança na sequência C-terminal de aminoácidos (Gly Trp Met Asp Phe NH₂), necessário para permitir sua ligação aos receptores presentes nas células (Figura 6). A diferença entre a CCK e a caeruleína é que a caeruleína tem a trionina no lugar da metionina, além de dois resíduos adicionais n-terminais em sua estrutura (Yang et al., 2020).

Figura 6: Semelhança estrutural da caeruleína com os hormônios CCK e Gastrina.



Fonte: AUTORA (2023).

A caeruleína e a gastrina possuem o penta peptídeo C-terminal e o piroglutamil N-terminal em sua estrutura, e da mesma forma ambos os contêm um resíduo tirosinil como éster de sulfato (Anastasi et al., 1967), entretanto diferem quanto aos resíduos adicionais n-terminais ligados ao tirosinil como éster de sulfato em sua estrutura. Essas semelhanças sugerem que a caeruleína é um peptídeo ortólogo aos hormônios gastrina e CCK de vertebrados (Sekiguchi, 2016) e que os peptídeos podem compartilhar uma história evolutiva comum.

3.3.2 Mecanismo de ação da caeruleína

A caeruleína ativa a gastrina endógena e a sinalização de CCK em vertebrados. Estudos funcionais demonstraram que a caeruleína purificada e sintética apresentam efeitos biológicos semelhantes aos da CCK através de sua ligação com os receptores CCK1 e CCK2 no corpo. Uma vez ligados, ocorre a indução da contração da vesícula biliar e secreção de enzimas pancreáticas são realizadas via CCK1 (Sekiguchi, 2016). Os receptores CCK2 atuam indiretamente na musculatura lisa, quando ativados causam a liberação de acetilcolina nos nervos colinérgicos do plexo mioentérico. A acetilcolina por sua vez ativa os receptores muscarínicos: M1 na mucosa gástrica, M2 nos músculos lisos e M3 nos ácinos (Bowie, 2013). A gastrina quando ativada endogenamente estimula a produção de HCL e a secreção da pepsina, além de estimular fluxo pancreático, a secreção de bicarbonato e enzima, e o fluxo biliar hepático (Hess, 1969).

Doses elevadas de caeruleína induzem a um aumento significativo nas enzimas pancreáticas séricas, edema intersticial pancreático, aumento da permeabilidade vascular e pressão hidrostática além da presença de infiltrado de células inflamatórias no local (Lerch et al., 1995; Weidenbach et al., 1995). Os efeitos fisiológicos ocorrem nos primeiros 15 minutos após a administração da caeruleína com a formação de grandes vacúolos autofágicos. Os vacúolos são resultado da fusão dos grânulos de zimogênio dentro da célula acinar, acompanhado pelo aumento na atividade lisossomal e ativação do tripsinogênio, que culmina em necrose celular. À medida que a PA progride, os vacúolos dobram de tamanho. Após 6 horas da injeção a inflamação intersticial e necrose acinar são proeminentes, atingindo o pico máximo após 12 horas e geralmente desaparecem após 4 dias. As alterações fisiológicas são resolvidas

dentro de uma semana após as injeções, entretanto durante a regressão da PA induzida, a atrofia foi um achado histológico notável (Niederrau et al., 1985). A indução da PA por meio da caeruleína foi testada em ratos, camundongos, suínos, coelhos, cães e hamsters e todos os animais sobreviveram ao processo (Willemer et al., 1992).

3.3.3 Indução da PA por caeruleína

Devido à dificuldade no acesso ao pâncreas em intervenções aguda ou para realização de biópsias, a fisiopatologia da PA é estudada usando modelos animais. Modelos experimentais de PA usualmente são performados em roedores ou culturas de células (Petejova e Martinek, 2013). Inicialmente, a indução da PA por secretagogo em roedores era realizada por inserção intravenosa na veia da caudal ou cateter na veia jugular. A caracterização da forma leve e reversível de pancreatite foi realizada em 1977 por Lampel e Kern, através da administração intravenosa de altas concentrações de CCK ou caeruleína, em ratos (Lampel e Kern, 1977). Subsequentemente, essa metodologia para indução da PA foi modificada para aplicação de injeções intraperitoneais (Niederrau et al., 1985) e é utilizada até os dias atuais.

O método *in vivo* foi descrito um ano após o estabelecimento do modelo de indução da PA por secretagogo (Williams et al., 1978). A técnica inicial consistiu no isolamento de ácinos pancreáticos, grupos de 3-80 células do pâncreas de roedores. Este processo foi posteriormente adaptado para realizar o isolamento de ácinos de outras espécies, incluindo seres humanos. Nela o pâncreas é digerido com colagenase e os ácinos podem ser isolados e mantidos em meio tamponado por até 4 horas, sem perder sua sinalização intracelular e capacidade de secreção. Esta técnica é muito válida para estudos direcionados ao processo de sinalização interna e secreção acinar (Gorelick e Lerch, 2017). Contudo, este modelo não replica a complexa associação dos ácinos com células não-acinares do pâncreas *in vivo*.

O protocolo amplamente utilizado hoje para a indução de PA em camundongos e ratos envolve 7 injeções intraperitoneais de 50 µg/kg de peso corporal de ceruleína sintética, com intervalo de 1 hora entre as injeções. Entretanto, o modelo de roedores apresenta diferença quanto aos efeitos da caeruleína após a indução (Gorelick e Lerch, 2017). Assim, um estudo comparativo entre ratos e camundongos apontou que

a caspase-3 efetora e as caspases-9 e -8 iniciadoras foram fortemente ativadas durante a PA por caeruleína em rato, mas não no camundongo. Além disso, em ratos o inibidor endógeno de caspase (XIAP) sofreu degradação completa estimulando a necrose e piorando o quadro da PA. Já nos camundongos, o XIAP permaneceu intacto e diminuiu o grau de apoptose no pâncreas (Mareninova et al., 2006).

Dessa forma, para melhorar o entendimento da fisiopatologia básica da PA e auxiliar na busca por terapias clínicas relevantes, novos métodos em modelos animais devem ampliar a compreensão da PA em comparação aos estudos documentados e validar os seus achados clínicos. Para isso, estudos da PA em modelos alternativos como zebrafish podem ajudar a superar deficiências metodológicas comuns com modelos de roedores.

3.4 ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

O *Danio rerio* conhecido popularmente como paulistinha, é um peixe teleósteo tropical de água doce pertencente à família Cyprinidae. Seu habitat original são as águas paradas ou lentas dos rios e riachos do sul da Ásia, podendo ser encontrado originalmente em países como a Índia, Nepal e Bangladesh (Arunachalam, Raja et al., 2013). Na sua vida livre, alimenta-se principalmente de nematoides ou zooplâncton (McClure, McIntyre et al., 2006; Rowena, Rebecca et al., 2007), possui o ciclo de vida curto vivendo em média três anos e atingem, no máximo, 5 cm de comprimento pesando até $0,4 \pm 0,1$ g (Lawrence, 2007), (Figura 7).

Figura 7: Foto do *Danio rerio*.



Fonte: Ferreira (2018)

Como característica do dimorfismo sexual desta espécie, os machos são geralmente mais delgados e escuros que as fêmeas. Quando adultos, possuem barbatanas dorsal, peitoral, anal e caudal, conferindo rapidez durante o nado (Kwon et al., 2019). A característica mais marcante na espécie é a presença de listras pretas/azuis e brancas/prateadas ao longo do corpo e nas nadadeiras, que por causa delas foram apelidados de zebrafish ou “peixe zebra” (Engeszer et al., 2007; Lawrence, 2007). O zebrafish é umas das espécies de animais que se adaptam facilmente ao ambiente em que se encontram, podendo sobreviver normalmente em ambientes com temperaturas variando de 24,6° a 38,6° C (Engeszer, Patterson et al., 2007), na faixa de pH de 6,6 – 8,2 (McClure, McIntyre et al., 2006) e com variação de iluminação (Meyers, 2018).

Se reproduzem normalmente em áreas rasas e vegetadas sob influência da luz ao amanhecer (Engeszer, Patterson et al., 2007), podendo ocorrer reprodução em qualquer estação do ano (Rowena, Rebecca et al., 2007). Sua reprodução é externa, ocorre através da deposição na água de espermatozoides e ovócitos maduros liberados pelos exemplares adultos. A atividade reprodutiva inicia-se nas primeiras horas da manhã em que ocorre a luminosidade, após exposição ao escuro. Os ovócitos são então fertilizados pelos espermatozoides gerando assim o embrião. Esta espécie apresenta uma fecundidade elevada, uma fêmea na idade adulta produz grandes quantidades de ovócitos maduros em cada postura, podendo liberar centenas até mesmo mil ovócitos de uma só vez (Reed e Jennings, 2011).

O desenvolvimento embrionário é externo e seus ovos são grandes e transparentes, podendo ser visualizado a olho nu, Figura 8.

Figura 8: Foto embriões do *Danio rerio* com 2 horas após a fertilização.



Fonte: AUTORA (2023).

Os embriões do zebrafish desenvolvem-se rapidamente, a primeira clivagem inicia-se aos 45 minutos, posteriormente a fertilização e a embriogênese se completa com 96 horas após a fertilização (hpf) já com a maioria dos órgãos formados e funcionando. As larvas eclodem por volta de 48 a 72 hpf, gradualmente após a eclosão, vão consumindo a vesícula vitelina até o momento em que seu tubo digestivo e a boca completam seu desenvolvimento, por volta de 15 dias após a fecundação (Kimmel, Ballard et al., 1995).

Este pequeno vertebrado foi descrito pela primeira vez pelo médico Francis Hamilton, em 1822 através de pesquisas para desbravar a fauna e flora do rio Kosi, Índia (Arunachalam, Raja et al., 2013). Um século depois, em 1970 foi gradativamente introduzido no ambiente laboratorial (Meyers, 2018). O zebrafish é uma das espécies mais utilizadas em estudos de diversas áreas biomédicas (Shin e Fishman, 2002).

3.4.1 Fisiologia

Por ser um organismo vertebrado, a padronização básica dos órgãos humanos é conservada neste modelo animal (Kinkel e Prince, 2009). Da mesma forma que nos humanos, os dentes do zebrafish são cobertos com esmalte, as coroas são originadas a partir da dentina e a polpa dentária contém odontoblastos, sangue, vasos sanguíneos e nervos (Gözde Ece e Karaman, 2020). Os intestinos anterior e médio apresentam vilosidades (Menke, Spitsbergen et al., 2011), além da presença de enterócitos absorptivos, células caliciformes e células enteroendócrinas, as mesmas são análogas em estrutura e função às encontradas no intestino dos mamíferos (Wallace e Pack 2003; Zhao e Pack, 2017). O fígado do zebrafish é semelhante aos humanos na composição celular, função, sinalização, resposta a lesões e as vias de sinalização do tecido hepático (Lu, Ho et al., 2015; Goessling e Sadler, 2015).

O rim do zebrafish compreende a mesma organização estrutural típica semelhante aos mamíferos (Zhou, Boucher et al., 2010). Possui morfologia cardíaca simples, sendo composta por apenas duas câmaras, com um átrio e um ventrículo (Verkerk e Remme, 2012) e seu desempenho eletrofisiológico é semelhante ao do coração humano, a maior parte dos genes têm seus ortólogos no zebrafish (Echeazarra, Hortigón-Vinagre et al., 2020). A formação do sistema vascular no

zebrafish segue o padrão semelhante ao de outros vertebrados (Lawson e Weinstein, 2002; Beis e Stainier, 2006; Ellertsdóttir et al., 2010).

O cérebro possui alta homologia fisiológica e genética com o cérebro humano (Kalueff, Stewart et al., 2014), além de também possuir a conservação estrutural anatômica e subdivisões do sistema nervoso central e sistema nervoso periférico (Guo, 2009). O zebrafish exhibe o sistema endócrino com os mesmos elementos básicos dos vertebrados superiores (Roberts e Ellis, 2012). Assim como nos mamíferos, o tecido ósseo deste teleósteo também é formado por estruturas básicas fundamentais como fibras de colágeno tipo I e células esqueléticas (Aceto et al., 2015; Kwon et al., 2019). Estruturalmente, o músculo esquelético é análogo ao do humano apresentando fibras musculares lentas, rápidas e intermediárias (Lin, 2012; Maves, 2014; Daya et al., 2020).

Os fatores de transcrição e vias de sinalização que regulam a hematopoiese nos humanos são conservados no zebrafish (Ellett e Lieschke, 2010; Jagannathan-Bogdan e Zon, 2013). O plasma é semelhante ao dos mamíferos, o sistema imunológico e as funções proteicas são análogas às encontradas nos vertebrados (Roberts e Ellis, 2012). Os quimiorreceptores presentes nas brânquias do zebrafish e nos pulmões dos mamíferos são originados das mesmas estruturas embrionárias (Jonz et al., 2004; Mierzwa et al., 2020).

3.4.1.1 Pâncreas do Zebrafish

Neste modelo experimental, o desenvolvimento do pâncreas começa no estágio de 10-somitó. A formação dorsal do pâncreas ocorre já nas primeiras 24 hpf e a porção ventral se forma em 32 hpf (Biemar, Argenton et al., 2001). O botão dorsal dá origem às células endócrinas, enquanto o botão ventral se diferencia em ducto pancreático e a um pequeno grupo de células endócrinas, após sua expansão origina a cauda do pâncreas e se diferenciam em tecido exócrino (Field, Dong et al., 2003).

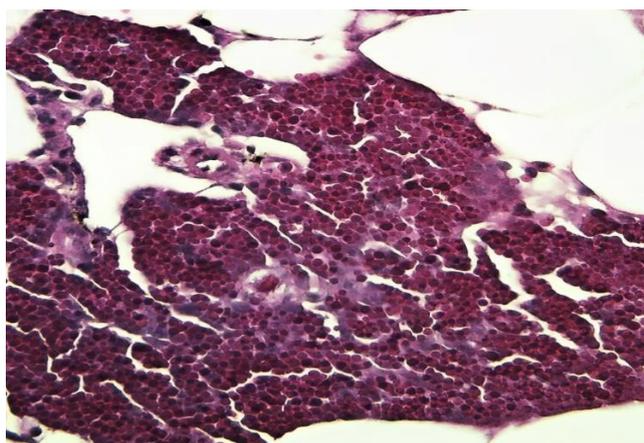
O pâncreas do zebrafish está localizado adjacente ao intestino, é pequeno e alongado, menor que 1 mm de diâmetro, e apresenta seu tecido opaco (Gnügge, Meyer et al., 2004). No zebrafish o pâncreas detém semelhanças na organização básica, na constituição celular, vias de sinalização, função e na expressão de genes relacionados ao pâncreas dos mamíferos, sugerindo que o mecanismo que controlam

a formação do pâncreas são evolutivamente conservados (Ober et al., 2003, Field et al., 2003). Estudos a respeito do desenvolvimento pancreático do zebrafish oferecem uma tremenda oportunidade para identificar genes que regulam o desenvolvimento do órgão e podem servir como um importante método para identificar marcadores celulares e patologias relacionadas a mutações genéticas. A respeito disso, o pâncreas endócrino do zebrafish tem sido particularmente explorado, a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento e função endócrina já estão bem estabelecidos na literatura (Freudenblum et al., 2020) tais como: hb9 (Wendik et al., 2004) e PDX-1 (Kimmel et al., 2015). Em contraste, pouco se sabe sobre a natureza do desenvolvimento exócrino pancreático e é provável que muitos de seus reguladores essenciais sejam novos genes (Yee et al., 2001).

No pâncreas endócrino as ilhotas estão localizadas adjacentes à vesícula biliar e dispersas no tecido exócrino, sendo composta por três tipos de células: as células α produtoras de peptídeo semelhante ao glucagon, células β produtoras de insulina e células δ produtoras de somatostatina (Menke et al., 2011; Prince, Anderson et al., 2017). As ilhotas e os hormônios peptídicos sintetizados podem ser localizados imunohistoquimicamente usando anticorpos produzidos contra insulina, glucagon e somatostatina de mamíferos (Yeel et al., 2001).

A estrutura dos ácinos é análoga à dos mamíferos (Menke, Spitsbergen et al., 2011), as células acinares pancreáticas no zebrafish apresentam um núcleo localizado na base e uma região eosinofílica apical onde se concentram grânulos de zimogênios (Figura 9).

Figura 9: Histologia do pâncreas do zebrafish. Vasos sanguíneos e grupamentos de ácinos contendo os grânulos de zimogênios são visualizados. Seção corada com H&E.



Fonte: AUTORA (2023).

Os grânulos contêm enzimas digestivas como amilase, peptidases e lipase (Wendik et al., 2004) que também podem ser identificadas bioquimicamente e imunohistoquimicamente usando anticorpos criados contra proteínas de mamíferos como a Carboxypeptidase A (Dilorio et al., 2002) e tripsina (Korzsh et al., 1998).

3.4.2 Zebrafish como modelo biológico

O uso de animais em com fins científicos iniciou-se por volta do século V a.C, porém, seu emprego só foi crescente a partir do século XIX (Raimyndo e Goldim, 2002). Por volta de 1865 a partir de estudos realizados na área de fisiologia foram estabelecidos princípios do uso de animais como modelo de estudo para a fisiologia humana (Bernad, 1865). Desde então, os animais são largamente utilizados em pesquisas e muitos progressos na área da saúde foram obtidos a partir de seu advento; sendo exemplo disso, os 94 dos 106 prêmios Nobel concedidos para as áreas de fisiologia e medicina foram para pesquisas em que se utilizaram animais como modelo experimental (Pasquali, 2018). Os roedores são os animais usados com mais frequência nas pesquisas, todavia, recentemente um novo vertebrado vem recebendo destaque no âmbito científico: o zebrafish.

Este exemplar ingressou nos laboratórios de pesquisa no final da década de 1970, através do biólogo norte-americano George Streisinger. Em seus trabalhos na área de genética voltados para identificar defeitos em diferentes genes e suas consequências no desenvolvimento, utilizou o zebrafish como modelo animal (Fishman, 2001). Em 1981, Streisinger publicou seu artigo na revista Nature apresentando o mesmo como novo modelo alternativo (Streisinger et al., 1981). A partir disto, o número de artigos científicos utilizando o zebrafish como modelo biológico cresceu rapidamente e se tornou o popular nas pesquisas biomédicas nas áreas de genética, desenvolvimento, comportamento e recentemente vem obtendo destaque na neurociência. (Chakraborty et al., 2016). Outro estudo importante para difusão do zebrafish em pesquisas foi o trabalho publicado por Kimmel et al. em 1995 sobre o desenvolvimento embrionário, nele foi detalhado por completo todos os estágios de desenvolvimento embrionário do zebrafish (Kimmel et al., 1995). Esse fato

atraiu pesquisadores de diversas áreas como a neurologia (Khan, Collier et al., 2017), biologia do desenvolvimento, toxicologia e metabolismo celular (Santoro, 2014).

Além de ter fácil e baixo custo de manutenção quando comparado com outros modelos, este vertebrado vem adquirindo notabilidade em pesquisas por possuir todo seu DNA sequenciado e apresentar mais de 70% de similaridade com o genoma de referência humano (Howe et al., 2013). Por possuir homologia genômica e fisiológica com os seres humanos, os seus sistemas cardiovascular, nervoso e digestivo são semelhantes aos humanos, bem como suas vias de sinalização (Beliaeva et al., 2010). Devido à sua clareza óptica e a capacidade reprodutível, o zebrafish tornou-se um dos modelos de doenças genéticas humanas (Sarasamma et al., 2017).

Dentre as principais vantagens para utilização deste modelo animal, uma delas é em relação ao tempo de vida. O zebrafish possui o ciclo de vida curto quando comparados com os roedores, ou seja, atingem a idade reprodutiva em torno de 60 a 90 dias e vivem cerca de três anos. Com isso, este animal torna-se um meio barato para testar os efeitos de drogas ou produtos químicos sem a necessidade de utilização de vários animais para execução dos testes (Chan e Williamson, 2018). Também é possível obter resultados rápidos sobre o efeito de drogas no organismo, já que são administradas poucas quantidades e as respostas são imediatas se comparadas com outros modelos animais de maior porte. Todas essas vantagens o tornaram um importante modelo vertebrado em inúmeras áreas de investigação tais como comportamental, genética, toxicologia e fisiologia (Kinth et al., 2013; Fang et al., 2014; Steele et al., 2014).

Considerado animal modelo para estudos neurológicos humanos, o zebrafish atualmente é empregado em diversos estudos de neurotoxicidade (Faria, Ziv et al., 2018; Faria et al., 2019), neurofarmacologia (Bao, Volgin et al., 2019; Faria, Prats et al., 2019; Pitchai, Rajaretinam et al., 2019) e também em vários distúrbios cerebrais, como exemplo: depressão, autismo, psicoses, abuso de drogas, déficits cognitivos e hiperatividade (Kalueff, Stewart et al., 2014; Fontana, Franscescon et al., 2019). Estudos recentes reproduziram o zebrafish como poderoso modelo animal para pesquisas em comportamentos convulsivos locomotores para compreender a função dos genes relacionados à epilepsia (Griffin, Krasniak et al., 2016). De natureza igual, o zebrafish também é utilizado como modelo para avaliar efeitos de drogas pró-convulsivas, por apresentar a barreira hematoencefálica semelhante aos vertebrados

superiores e com permeabilidade de macromoléculas substancial, tornando este animal um modelo genético experimental atraente para aplicações, triagem e descoberta de novas drogas anticonvulsivantes (Jeong, Kwon et al., 2008; Eliceiri, Gonzalez et al., 2011).

Outra área bastante estudada da neurociência utilizando o zebrafish é o estresse e seus efeitos no sistema nervoso central e no comportamento. Em condições de estresse, o hormônio liberado é o cortisol no peixe assim como no homem. Nos roedores, o hormônio produzido sob essas condições é a corticosterona, que é liberado em concentrações muito baixas no homem. Esse é um dos casos em que zebrafish oferece maior vantagem sobre os roedores da sua utilização em pesquisas (Zorzetto e Guimarães, 2013). Além disso, o zebrafish apresenta mecanismos de defesa antioxidantes semelhantes aos identificados em humanos, essa analogia traduz a relevância do uso de teleósteos como o zebrafish para estudos ligado a função mitocondrial e ao estresse oxidativo (Azevedo, et al., 2020) e as mitocôndrias do zebrafish ainda funcionam como marcadores de toxicidade à compostos químicos (Vasconcelos, Goulart et al., 2007; Azevedo et al., 2021).

O uso do zebrafish ainda é adequado para estudos em outros órgãos como cérebro, coração, olhos, intestino, sangue e sistemas, como exemplo o sistema renal e o sistema endócrino (Gut, Reischauer et al., 2017). Também é um bom modelo para estudo de condições metabólicas, uma vez que o seu controle metabólico é muito semelhante aos mamíferos. Assim, medicamentos antidiabéticos como metformina e redutores de colesterol como sinvastatina também possuem efeitos terapêuticos no zebrafish (Baek et al., 2012; Gut, Baeza-Raja et al., 2013). Dessa forma, sua popularidade como modelo experimental vem crescendo a cada dia (Sundin, Morgan et al., 2019).

Os resultados desta tese serão apresentados em forma de artigo, sendo um artigo de revisão e um artigo de experimentação.

4. RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1

Research, Society and Development, v. 11, n. 1, eXX, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.XXXXX>

Global analysis to acute pancreatitis: a systematic review

Análise global da pancreatite aguda: uma revisão sistemática

Análisis general de la pancreatitis aguda: revisión sistemática

Received: 08/09/2022 | Reviewed: 08/19/2022 | Accept:08/20/2022 | Published: 08/29/2022

Kívia Vanessa Gomes Falcão

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7924-1250>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: kivia.falcao@ufpe.br

Rafael David Souto de Azevedo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1310-7662>
Universidade de Pernambuco, Brasil
E-mail: rafaeldavidbio@gmail.com

Luiza Rayanna Amorim de Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8990-5636>
Universidade de Pernambuco, Brasil
E-mail: luiza.amorim@upe.br

Ranilson de Souza Bezerra

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6657-3782>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: ransoube@uol.com.br

Abstract

Acute pancreatitis (AP) is one of the most common emergencies causes of hospitalization for gastrointestinal diseases. Many studies in different countries have been performed to identify the etiology, pathomechanisms and therapeutic strategies for AP treatment. This systematic review perform a global analysis of knowledge production about AP. The SCOPUS database using for our systematic review. The study considers the period between 2016 and 2020 and considered scientific journals with respect to the subject of publications, quantity of studies published, citations and leading countries in this area of research. A total of 75 publications were eligible among 16,563 records in the database. The subjects most discussed in the articles is the search for new drugs and therapies for the treatment of AP is a central concern of the researchers involved in the study of AP (26.6%). The etiology of AP corresponded to n = 11 articles (14.6%), highlighting the recent focus on the causes of AP such as hypertriglyceridemia (HTG). The results show that AP is becoming a globalized subject. Altogether, institutions from 36 countries contributed to the knowledge of pancreatitis over the period considered. The USA has the most publications (20) and occupies the vanguard position on the subject. China is the second largest center in AP knowledge production (17). The recent evidence in the form of systematic reviews represent a viable tool to understand the patterns in knowledge production about AP and to identify gaps in the networks about the subject.

Keywords: Humans; Acute pancreatitis; Therapeutics; Incidence.

Resumo

A pancreatite aguda (PA) é uma das causas emergenciais mais comuns de internação por doenças gastrointestinais. Muitos estudos em diferentes países têm sido realizados para identificar a etiologia, os mecanismos patológicos e as estratégias terapêuticas para o tratamento da PA. Esta

revisão sistemática realiza uma análise global da produção de conhecimento sobre PA. O banco de dados SCOPUS usado para nossa revisão sistemática. O estudo considera o período entre 2016 e 2020 e considerou periódicos científicos no que diz respeito ao assunto de publicações, quantidade de estudos publicados, citações e países líderes nesta área de pesquisa. Um total de 75 publicações foram elegíveis entre 16.563 registros na base de dados. O assunto mais discutido nos artigos é a busca por novos medicamentos e terapias para o tratamento da PA é uma preocupação central dos pesquisadores envolvidos no estudo da PA (26,6%). A etiologia da PA correspondeu a n = 11 artigos (14,6%), destacando-se o foco recente nas causas da PA como a hipertrigliceridemia (HTG). Os resultados mostram que a PA está se tornando um assunto globalizado. Ao todo, instituições de 36 países contribuíram para o conhecimento da pancreatite no período considerado. Os EUA são os que mais publicam (20) e ocupam a posição de vanguarda no assunto. A China é o segundo maior centro de produção de conhecimento de PA (17). As evidências recentes na forma de revisões sistemáticas representam uma ferramenta viável para compreender os padrões de produção de conhecimento sobre PA e identificar lacunas nas redes sobre o assunto.

Palavras-chave: Humanos; Pancreatite Aguda; Terapêutica; Incidência.

Resumen

Include the abstract in Spanish. La pancreatitis aguda (PA) es una de las causas de urgencia más frecuentes de hospitalización por enfermedades gastrointestinales. Se han realizado muchos estudios en diferentes países para identificar la etiología, los mecanismos patológicos y las estrategias terapéuticas para el tratamiento de la PA. Esta revisión sistemática realiza un análisis global de la producción de conocimiento sobre PA. La base de datos SCOPUS utilizada para nuestra revisión sistemática. El estudio considera el período comprendido entre 2016 y 2020 y consideró las revistas científicas en cuanto al tema de las publicaciones, número de estudios publicados, citas y países líderes en esta área de investigación. Un total de 75 publicaciones fueron elegibles entre 16.563 registros en la base de datos. El tema más discutido en los artículos es la búsqueda de nuevos fármacos y terapias para el tratamiento de la PA es una preocupación central de los investigadores implicados en el estudio de la PA (26,6%). La etiología de la PA correspondió a n = 11 artículos (14,6%), destacando el enfoque reciente sobre las causas de la PA como la hipertrigliceridemia (HTG). Los resultados muestran que la PA se está convirtiendo en un tema globalizado. En total, instituciones de 36 países contribuyeron al conocimiento de la pancreatitis en el período considerado. Estados Unidos es el que más publica (20) y ocupa una posición de liderazgo en el tema. China es el segundo mayor centro de producción de conocimiento de PA (17). La evidencia reciente en forma de revisiones sistemáticas representa una herramienta viable para comprender los patrones de producción de conocimiento sobre PA e identificar brechas en las redes sobre el tema.

Palabras clave: Humanos; Pancreatitis aguda; Terapéutica; Incidencia.

Introduction

The overall incidence of acute pancreatitis (AP) has been growing regularly, and the number of cases has increased by more than 20% in the past 20 years. Acute pancreatitis has assumed the position as one of the most frequent causes of hospitalization for gastrointestinal diseases. AP has a mortality rate for severe cases ranging from 5% to 17% (Chatila et al., 2019; Bálint et al., 2020). The inflammatory pathways that may lead to the triggering of AP are still unclear, but there are indications including oxidative stress related to mitochondrial dysfunction, alcohol consumption, gallstones and hypertriglyceridemia (HTG) that have been considered the main current etiological causes of AP (Yu & Kim, 2014; Jo et al., 2019; Pasari et al., 2019).

AP is characterized by a slight increase in the size of the pancreas, accompanied by inflammation, local edema, and the presence of necrosis in the pancreatic parenchyma (Zhang et al., 2014). Inflammation of the pancreas results from the self-management of acinar cells that triggers a cascade of cellular reactions, including the release of inflammatory mediators and increased permeability, resulting in cell death (Bradley, 1993; da Cunha, 1994). The prognosis of AP depends mainly on the variable involvement/failure of adjacent organs. Thus, mild AP is associated with local

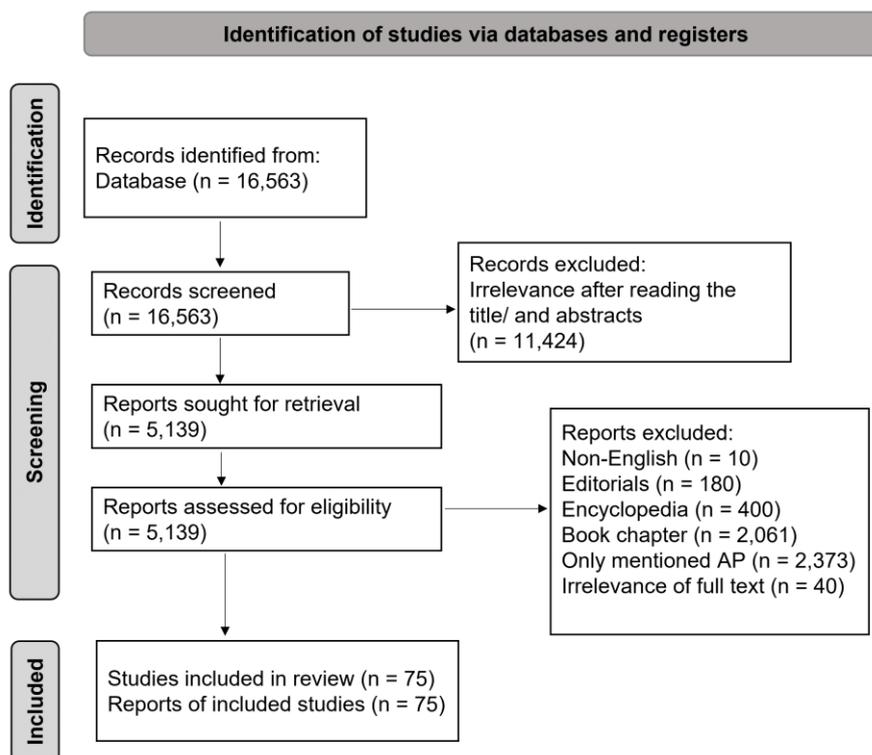
lesions in and around the pancreas and can evolve into severe AP with the development of systemic inflammatory response syndrome (SIRS), which is systemic inflammation with impairment and failure of several organs (Garg & Singh, 2019).

Although not fully elucidated, the understanding of AP pathophysiology has been achieved through experimental trials in animal models with AP induction by peptides such as caerulein (Sun et al., 2020) and amino acids such as L-arginine (Zhu et al., 2016). In addition, population-based cohort studies and systematic literature reviews have also been performed (Petrov & Yadav, 2019). The knowledge acquired through research has provided a greater understanding of the biological and clinical characteristics of AP. However, Meta-Analysis studies in this field are still scarce. Identifying AP-related publications and mapping the occurrence of global production based on available research is crucial to enable indications of the current situation of AP knowledge production in the world. Thus, this study aims to identify the production of knowledge about AP indexed in the Scopus database using Meta-Analysis to identify possible gaps, recent trends and spatial and temporal variations.

Methodology

This systematic review and meta-analysis reported according to preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses PRISMA 2020 (Moher et al., 2009). To identify potentially relevant documents, Scopus was searched broadly on 10 to 25 March 2021. The medical subject headings (MeSH) utilized were "humans", "acute pancreatitis", "therapeutics", "incidence", "disease severity"; according to the research question "What current insights of acute pancreatitis in the world?". The inclusion criteria of this overview of systematic review were 1) articles published in the period from 2016 to 2020, 2) articles addressing AP. We excluded encyclopedia, editorials, other than English language, book chapter and studies not suitable with this systematic review and meta-analysis. At first, we screened through the title and abstracts of the search results. Then we screened for the full text papers as explained on PRISMA flowchart, Figure.1.

Figure 1: PRISMA Flow Diagram.



Source: Authors (2022).

Assessments of study quality was undertaken for two reviewers (KVGf, RDSA) screened all titles and abstracts retrieved from the search for studies that met the inclusion criteria. The studies that potentially met the inclusion criteria were reviewed and the final decision to include or exclude studies was made by consensus. A single investigator (KVGf) charted all data from eligible papers. For the definition of AP, studies were considered high quality if they addressed important data on AP, therapeutic measures and epidemiology. Two other researchers verified the data for accuracy (LRAL and RSB).

Others data collected were study design, country of study origin, the journals in which the works were published and the main journals focused on the field/branch of gastroenterology. The country and continent of origin of the authors as well as the number of citations and the countries that were citing the selected works were also analyzed.

Results and Discussion

Our search yielded 16,563 publications, based on the title and the abstract 11,424 articles were excluded due to not suitable. After that, we continue to review the remaining 5,139 potential papers, then we exclude 10 papers that were not in English, 180 papers of editorials, 400 papers encyclopedia, 2,062 book chapter, 2,373 articles only mentioned AP without addressing the topic and 40 papers due to not suitable with the scope of this systematical review and meta-analysis. After the exclusion criteria were applied, selected 75 studies for inclusion in the review for this overview of systematic reviews.

The studies included in the meta-analysis, most of the publications analyzed (25.3%, n = 19)

were published between 2016 and 2019, followed by the publications of 2020 (n = 18 articles, 24%) (Table 1). However, 2017 and 2018 showed a decrease in the quantity of published works, reaching n = 7 articles in 2018 (9.3%) (Table 1). The number of citations was higher in 2016 (n = 377 citations), which corresponds to 36.2% of the recorded citations in the period considered. Then, it was observed that 2019 recorded a total of 259 citations. The year 2018, despite having only 7 articles related to the topic, registered n = 165 quotes (15.9%). Although this percentage is low compared to that observed in 2019, this number of citations can be considered significant, as the number of articles published this year was much lower than in the other years. In this sense, despite being recent, the articles published in 2020 already have 40 citations, representing 4.26% of the total.

The results show that AP is becoming a globalized subject. Altogether, institutions from 36 countries contributed to the knowledge of pancreatitis over the period considered (Table 1). The year 2019 recorded publications from 12 countries comprising 33.3% of the total number of countries observed. In 2012, the participation of 10 countries was observed, and in 2016, only 7 countries published on the topic. These data are highly distinct, and this divergence was also observed in subsequent years, with only 5 and 2 countries publishing AP-related articles in 2018 and 2020, respectively. With respect to the variable nationality of authors and coauthors, 33.3% of the coauthors are of different nationalities than the nationality of the first authors or of all authors, indicating the occurrence of partnerships with other countries in the works studied. The data show that the largest collaboration between different countries occurred in 2020 (9 countries).

Table 1: Overview of the dataset used, divided into five years. n = number registered, % = Percentage number registered, Total = Total number registered in the 2016 to 2020.

Description	2016		2017		2018		2019		2020		Total
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Articles	19	25.3%	12	16%	7	9.33%	19	25.3%	18	24%	75
Countries	7	19.4%	10	27.7%	5	13.8%	12	33.3%	2	5.5%	36
Coauthors from different countries	3	12%	5	20%	1	4%	7	28%	9	36%	25
Citations	377	36.2%	198	19%	165	15.8%	259	24.9%	40	3.8%	1.039

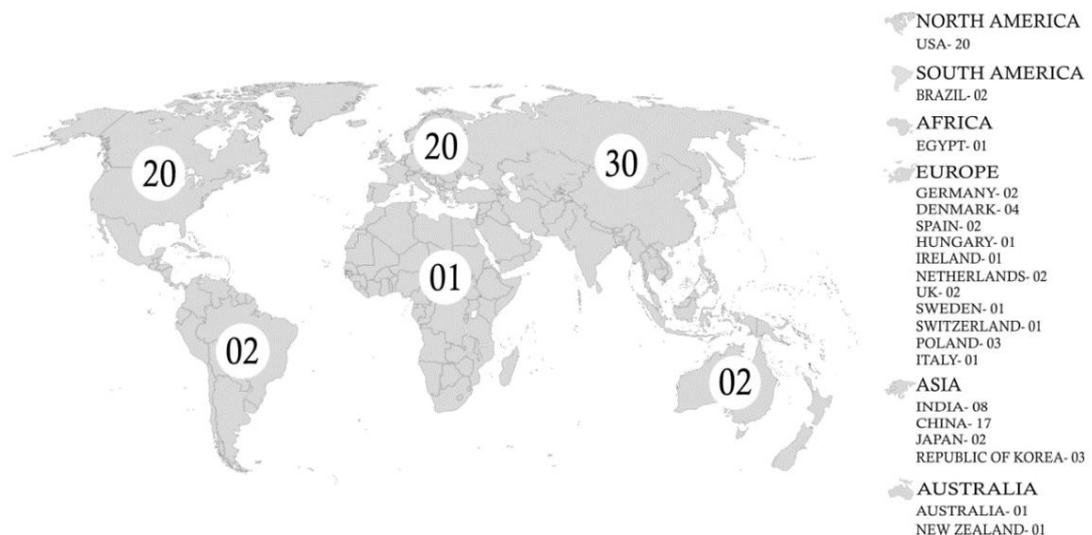
Source: Authors (2022).

Analysis of the production of knowledge by continent revealed that there is a predominance of publications from the Asian continent (n = 30 articles). Then, considerable North American (n = 20 articles) and European (n = 20 articles) production was observed (Figure 2). The USA and China were the most published countries during the selected period, with 20 and 17 articles, respectively, and the third most published was India, with 8 articles. Denmark published 4 articles, and Poland and the Republic of Korea published 3 articles each.

Major emerging economies, namely, Brazil, China and India, were present in the publications, with the exception of Russia and South Africa. The vast majority of European countries (Germany,

Denmark, Spain, Hungary, Ireland, the Netherlands, the United Kingdom, Switzerland and Poland) were represented in the database and together reached a total of 20 publications. This participation did not occur in countries on other continents, such as Africa and America. Only Egypt, Brazil and the USA appear in the publications. The remaining countries, such as Italy, New Zealand, Hungary, and Australia, published only one article on AP in the period considered.

Figure 2: Map of the world of AP-oriented publications distributed by continent and the respective countries publishing in the period 2016-2020.



Source: Authors (2022).

The articles selected for this study had 11 topics of greatest occurrence, whether the articles were experimental studies or literature reviews (Table 2). The etiology of AP as a study objective corresponded to $n = 11$ articles of the total of 75 (14.6%), highlighting the recent focus on the causes of AP such as HTG (Jo et al., 2019). The subject most noted in the publications was new intervention proposals identified as potential therapeutic strategies for the treatment of AP in $n = 20$ publications (26.6%). They highlight the efficiency of antioxidants such as quercetin and calicosin as inhibitors of the inflammatory response and oxidative stress (Zheng et al. 2016; Ma et al., 2018), as well as the action of some phytochemicals such as visnagin, berberine, chlorogenic acid, resveratrol and lycopene that have the potential to improve the symptoms of AP (Pasari et al. 2019; Tarasiuk & Fichna 2019).

AP biomarkers were discussed by 11 articles (Table 2), which reported the identification of light AP and severe AP by the use of markers. The combination of pancreatic enzymes, such as lipase, with calcium, albumin and leukocytes was shown to be a prognostic tool for the identification of the seriousness of AP, which can be evaluated within 24 hours after admission of the patient (Bierma et al., 2016; Szabo et al., 2016). More specific markers, such as reactive C protein (CRP) and IL-6, in cohort studies demonstrate the clinically relevant ability to identify severe AP (Sternby et al., 2017).

The prevalence of AP was discussed in 8 articles (10.6%). Through those articles, it could be

identified that biliary and alcoholic AP were the most common conditions for hospitalization of patients in Europe, India, South America and North America (Matta et al., 2020). The systemic effects of AP were discussed by 7 publications (9.33%), among which some articles addressed the emergence of bleeding, respiratory difficulty syndrome and intestinal damage as consequences of the disease (Barbeiro et al., 2016; Tang et al., 2018; Fei et al., 2019).

The inflammatory pathways of AP activation were studied in 5 publications (6.6%). In this context, cytokines and proinflammatory mediators derived from macrophages are involved, such as IL-1B and IL-18, in cascading reactions and the worsening of AP (Hu et al., 2020; Sandler et al., 2020). The variables of clinical management, physiopathology and prognosis were studied in three articles each. Interestingly, AP mortality rates were discussed in just two articles (Table 2). Mortality from AP thus constitutes one of the least discussed subjects on the topic. Little research has also been conducted in relation to AP and evolution to pancreatic cancer (n = 2 2.66%). In Denmark, it was identified that AP in patients presents a 0.8% risk of eveloping long-term pancreatic cancer five years after the identification of AP (Kirkegård et al., 2018). In this same country, it was found that the incidence of pancreatic cancer was higher in patients with AP who were older (> 50 years) or who had the onset of diabetes (Kirkegård et al., 2020).

Table 2: Topics present in selected articles on AP during the period 2016 - 2020.

Subject	N	%
Clinical management	3	4%
Etiology	11	14.6%
Evolution to câncer	2	2.66%
Inflammatory pathways	5	6.66%
Mortality	2	2.66%
Pathophysiology	3	4%
Potential new therapeutic treatments	20	26.6%
Prevalence	8	10.66%
Prognosis	3	4%
Systemic effect	7	9.33%
Biomarkers	11	14.6%
Total	75	

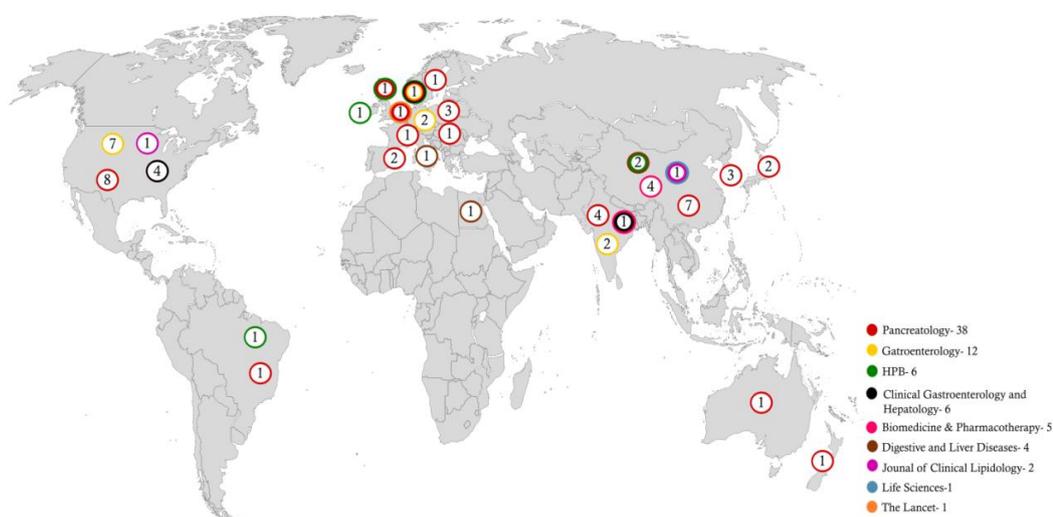
Source: Authors (2022).

The articles selected in the meta-analysis were published in nine journals: Gastroenterology, Pancreatology, Clinical Gastroenterology and Hepatology, Digestive and Liver Disease, Journal of Clinical Lipidology, Biomedicine & Pharmacotherapy, The Lancet Global Health, International Hepato-Pancreatic-Biliary Association - HPB, and Life Sciences. The Journal Pancreatology was responsible for 50.6% (n = 38) of the publications on the topic and was the main vehicle of information on AP. The journal Gastroenterology then accounted for 16% (n = 12) of the publications in the period considered.

HPB and Clinical Gastroenterology and Hepatology were responsible for 8% (n = 6) of publications each. The journal Biomedicine & Pharmacotherapy recorded 6.6% (n = 5) of the publications on AP. The journal Digestive and Liver Disease recorded 5.3% (n = 4) and the Journal of Clinical Lipidology 2.6% (n = 2) of papers on the topic. The journal Life Sciences and the journal The Lancet Global Health were responsible for only 1.3% (n = 1) of the publications each. The journal Pancreatology stands out for the greatest number of publications and the greatest diversity of countries publishing on the subject. Altogether, there are 16 countries publishing in Pancreatology, half of which belong to the European continent (Figure 3). Researchers in the United States stand out among the group as having the largest number of publications in this journal (8 articles). This fact is also repeated in the journal Gastroenterology; in the United States, researchers obtained the greatest number of publications (7 articles). Thus, the USA occupies the lead position of publications in the journal Gastroenterology when compared with the other countries, including Germany (2 articles), India (2 articles) and Denmark (1 article).

The journals Life Sciences and The Lancet Global Health received little coverage of the subject with few publications and origins from a single country each. Almost similar distributions were found in the periodicals Biomedicine & Pharmacotherapy and the Journal of Clinical Lipidology, which both had publications from two countries (Figure 3). On the other hand, countries such as Denmark and the United States have published in four different journals, and China has gained the lead in the number of journals (6 journals) by publishing studies in the journal Pancreatology, HPB, Digestive and Liver Disease, Biomedicine & Pharmacotherapy, Journal of Clinical of Lipidology and Life Sciences.

Figure 3: Map of the world with respect to AP-oriented publications distributed by journal in the period 2016-2020. Countries that contained the same number of publications in different journals have circles that overlap. Different colors represent different journals.



Source: Authors (2022).

Regarding the number of citations, the major highlight was the journal Pancreatology, which

received 43.3% of the citations (n = 450 citations), representing the leading journal in citations in the period considered. In addition, Pancreatology has recorded citations from all continents (Figure 4). In second place with respect to citations, Gastroenterology received 32.7% of citations (n = 340 citations). The articles in this journal have also been cited by all continents, and the highest number of citations in this journal comes from the Asian continent, corresponding to 160 citations out of 340 citations. The African, South American, and Australian continents have rarely cited studies published in this journal.

Figure 4: Map of the world with respect to citations distributed by journal on continents in the period 2016-2020. Different colors represent different journals.



Source: Authors (2022).

The journal Biomedicine & Pharmacotherapy (5 articles) and the journal Digestive and Liver Diseases (4 articles) obtained 63 and 50 citations, respectively (Figure 4). In addition, the citations received by the journal Biomedicine & Pharmacotherapy are mainly from the Asian continent (56 citations), characterizing 88.8% of its publications, a discrepant value compared to the African continent that made up only 4 citations, Europe with only 2 citations and South America with 1 citation. Proportionally, the journal Digestive and Liver Diseases and the Journal of Clinical Lipidology acquired 50 and 25 citations, respectively, according to the number of publications.

The HPB and Clinical Gastroenterology and Hepatology journals both published six articles each, but their citation numbers differed. With 59 citations, the journal HPB had greater representativeness with more cited articles compared to Clinical Gastroenterology and Hepatology with 39 citations. The same was true of the journals The Lancet Global Health and Life Science, which both published only one article and obtained 8 and 5 citations, respectively.

AP is a common disease in routine medical hospitalization, with 34 cases per 100,000 people/year worldwide (Zheng et al., 2021). Although many patients experience the mild form of disease with only local commitment of the pancreas, the disease can evolve rapidly to a systemic form and result in death. However, it is still necessary to understand the AP pathogeny, mechanisms that lead to its

activation and signaling as well as therapeutic measures and new treatments.

Among the themes found in publications related to AP by this review, four studies have shown that phytochemicals and antioxidants are efficient in improving AP conditions (Zheng et al., 2016; Ma et al., 2018; Pasari et al., 2019; Tarasiuk & Fichna, 2019). One of the studies carried out in Spain with 356 patients using statins as a drug for the treatment of AP found that patients who received statins had a 50% lower risk of suffering from severe AP and a 33% lower risk of developing local complications (Ruiz-Rebollo et al., 2019). Although the results are encouraging, it is important to emphasize that thus far, there are no clinically approved drugs or therapies.

The effectiveness of other chemical compounds for the treatment of AP, such as pentoxifylline, could not be proven, as a small number of patients were enrolled to perform randomized controlled clinical trials. In addition, the difficulty of including samples referring to all levels of disease severity can be identified (Vege et al., 2020). These issues also contribute to the hurdle in drug discovery for the treatment of AP.

The clinical management of patients with AP is very costly to health services. In the USA alone, the costs for treatment range from \$2 to \$3 billion annually (Mosko et al., 2020). The studies included in this review pointed out that the clinical management of patients with AP currently includes non-invasive methods such as administration of analgesics, antibiotics, fluid therapy, enteral nutrition and, in severe cases of AP, endoscopic retrograde cholangiopancreatography, and pancreatectomy (Koutroumpakis et al., 2017; Stigliano et al., 2017). Although there are still no clear guidelines regarding the early management of patients with AP and its prevalence continues to increase in Europe and the USA (Munigala & Yadav, 2016; Roberts et al., 2017), the mortality rate has been decreasing in recent years (Agarwal et al., 2016; Masamune et al., 2020).

This systematic review identified the search for biomarkers of AP stands out among recently published articles. Some markers have been shown to be efficient and promising, such as the soluble receptor of urokinase-type plasminogen activator (suPAR), which was detected at high levels in the serum of people in the early stages of AP by a cohort study carried out with 126 patients (Lipinski et al., 2017). However, although suPAR is low-cost and promising for the initial diagnosis of AP, it is not a specific marker and is also elevated in other inflammatory diseases, such as arthritis (Toldi et al., 2013) and hepatic fibrosis (Zimmermann et al., 2012). Other markers present in the studies were IL-6 and c-reactive protein (CRP), which were shown to be clinically relevant for the course of AP, mainly in the identification of severe AP (Sternby et al., 2017; Stirling et al., 2017). The superiority of IL-6 levels in diagnosing severe AP was reported by a recent study. IL-6 has sensitivity and specificity in the required range of 75% - 91% (van den Berg et al., 2020).

Currently, the usual diagnosis for identifying AP is detecting high levels of pancreatic enzymes circulating in the blood. However, there is also the possibility of the occurrence of false positive and negative diagnoses (Xiao et al. 2017). Regarding this situation, the quantification of pancreatic enzymes combined with biochemical and hematological markers such as calcium, albumin and leukocytes obtained in the first hours of patient admission helps to diagnosis AP and can be applied to predict severe forms of AP (Bierma et al., 2016; Szabo et al., 2016). It is evident that the identification of more accurate biomarkers for the diagnosis of AP still represents a challenge.

This review identified among the selected states that HTG is the 3rd most common etiological cause of AP, behind the main recurrent causes of admissions, such as gallstones and excessive alcohol consumption (Mosztbacher et al., 2020). The selected articles that addressed HTG as an etiology of AP still report that HTG is associated with greater severity of AP in patients when compared to other etiologies (Zhang et al., 2019; Mosztbacher et al., 2020), and its incidence is higher in younger patients, showing the occurrence of more frequent relapses than AP from other causes (Jo et al., 2019; Kim et al., 2020).

Another highlight in AP research is the search for new therapies to reduce the deleterious effects of disease. In this way, fluid therapy with saline solution is able to prevent tissue hypoperfusion. This is relevant because AP usually leads to endothelial lesions and an increase in vascular permeability, resulting in the leakage of fluids with high protein content into the interstitium (Garg & Mahapatra, 2021). Additionally, it is relevant to mention total pancreatectomy with islet autotransplantation (TPIAT) as an alternative method to treat patients with recurrent AP. TPIAT improves the quality of life and decreases the use of analgesics during the normal course of AP (Bellin et al., 2016).

The USA was the country with the most publications about AP in the world, reinforcing the scientific leadership of the USA. The difference between the USA and China is only three publications. Considering Chinese scientific growth, the possibility exists of the USA losing its international leadership in AP publications. Regarding this, the US National Science Foundation (NSF) reports that in terms of knowledge production, China published slightly more than 426,000 studies in 2016, equivalent to 18.6% of the total documented in the Scopus database, surpassing the 409,000 scientific publications of the USA (Tollefson, 2018).

China, Japan, South Korea, and India are the main countries responsible for publications about AP on the Asian continent. As expected, China has the leading role on the Asian continent. This result can be interpreted as a demonstration of Chinese investment in scientific research. This premise supports the fact that China has been getting stronger in science and technology. Today, China occupies 2nd place in the world ranking of scientific production, with a 63.5% share of scientific production published during the years 2015 to 2019 (Index, 2020; SCImago, 2021).

India occupies the 3rd position in AP knowledge production, exceeding countries such as Brazil (which has more science investment) and Egypt (which is an emergent country). Knowledge production about AP by the African continent is not expansive. In this review, only one article was published by African authors. Knowledge production depends on factors such as infrastructure and investment. Thus, exploration of the variables that are deeply involved in African knowledge production deserves attention.

The journal *Pancreatology*, had many publications and citations about AP, including publishing research from all continents. This is extremely relevant, as it provides greater power to spread knowledge and reach scientists around the world. Another noteworthy point is that specific journals related to the main area of this study, such as the journals *Pancreatology*, *Gastroenterology*, *Journal of Clinical Gastroenterology and Hepatology*, *HPB*, and *Digestive and Liver Disease*, published more works and were also more cited than nonspecific journals, such as the journals *Life Science*, *Journal of Clinical Lipidology* and *The Lancet Global Health*. The exception to this characteristic is the journal *Biomedicine & Pharmacotherapy*, which held the 3rd position for the number of citations from published

studies that address new drugs and therapeutic treatments for the disease as their main theme. Topics more closely related to the AP theme would have been expected.

This systematic review also identified the number of collaborations from different countries has increased in the last two years of the period studied (2019 – 2020). Moreover, in 2020, higher collaboration between different countries studying AP was observed. It is possible that the COVID-19 pandemic has provided an opportunity for remote contact between studies from different nationalities. It is expected that this situation has fomented visions and hypothesis formulations about AP.

Conclusion

AP is a complex disease with recurring hospital admissions. This Meta-Analysis reveals that AP is a theme that is discussed globally. The Asian, North American and European continents are the leaders in AP knowledge production. In this context, institutions from the USA and China play a central role in knowledge production, scientific collaboration, and citations. It is possible to assume that these issues are treated as an aspect of research with high quality. Additionally, it is relevant to emphasize that the search for new drugs and therapies to treat AP is a central concern of researchers involved in the study of AP. Moreover, this represents an opportunity to predict new horizons in AP research and to improve scientific/technological exchange around the world, especially in a decision-making context. Therefore, AP is a challenging subject with a lack of approaches for specific diagnosis and clinical treatment. In this way, considering the global analysis of AP knowledge production, it is hoped that AP challenges will be solved.

New perspectives for AP treatment can be reached the introduction of healthy genes through recombinant DNA techniques with the use of genes miR-148a and miR-141 for example, which are deeply involved in many physiological processes associated AP. Another potential treatment is through immunomodulation and gene therapy. Given the importance of immune cells such as neutrophils and macrophages in the physiopathology and severity of AP. These techniques can presente with a high potential to improve the prognosis of patients. However, it is necessary there is still much to be studied. Thus, AP is a complex disease with a high dependency on elucidation of the mechanisms leading to its activation and the signaling involved.

Acknowledgments

The authors are grateful for the financial support from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Pernambuco (PBPG-1320-2.07/2018; APQ-0166-4.03/19) and the, National Council for Scientific and Technological Develpmente (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – DCR-0010-4.03/20).

References

Adeleye, B. N., Gershon, O., Ogundipe, A., Owolabi, O., Ogunrinola I., & Adediran, O. (2020). Comparative investigation of the growth-poverty-inequality trilemma in Sub-Saharan Africa and Latin American and Caribbean Countries. *Heliyon*, 6 (12): e05631.

- Agarwal, S., George, J., Padhan, R. K., Vadiraja, P. K., Behera, S., Hasan, A., Dhingra R., & Garg, P. K. (2016). Reduction in mortality in severe acute pancreatitis: A time trend analysis over 16 years. *Pancreatology*, 16 (2): 194-199.
- Bálint, E. R., Fűr, G., Kiss, L., Németh, D. I., Soós, A., Hegyi, P., Szakács, Z., Tinusz, B., Varjú, P., Vincze, Á., Eröss, B., Czimmer, J., Szepes, Z., Varga, G., & Rakonczay, Z. (2020). Assessment of the course of acute pancreatitis in the light of aetiology: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 10 (1): 17936.
- Barbeiro, D. F., Koike, M. K., Coelho, A. M. M., da Silva, F. P., & Machado, M. C. (2016). Intestinal barrier dysfunction and increased COX-2 gene expression in the gut of elderly rats with acute pancreatitis. *Pancreatology*, 16 (1): 52-56.
- Bellin, M. D., Kerdsirichairat, T., Beilman, G. J., Dunn, T. B., Chinnakotla, S., Pruett, T. L., Radosevich, D. R., Schwarzenberg, S. J., Sutherland, D. E. R., Arain, M. A., & Freeman, M. L. (2016). *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 14 (9): 1317-1323.
- Bierma, M. J., Coffey, M. J., Nightingale, S., van Rheenen, P. F., & Ooi, C. Y. (2016). Predicting severe acute pancreatitis in children based on serum lipase and calcium: A multicentre retrospective cohort study. *Pancreatology*, 16 (4): 529-534.
- Bradley, E. L. (1993). A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis. *Arch Surg*, 128 (5): 586-590.
- Chatila, A. T., Bilal M., & Guturu, P. (2019). Evaluation and management of acute pancreatitis. *World journal of clinical cases*, 7 (9): 1006-1020.
- da Cunha, J. E. (1994). Acute pancreatitis: a clinically based classification. *Arq Gastroenterol*, 31 (2): 52-56.
- Davies, J., & Mullan, Z. (2016). Research capacity in Africa—will the sun rise again? *The Lancet Global Health*, 4 (5): e287.
- Di Bitetti, M. S., & Ferreras, J. A. (2017). Publish (in English) or perish: The effect on citation rate of using languages other than English in scientific publications. *Ambio*, 46 (1): 121-127.
- Fei, Y., Gao, K., & Li, W.-q. (2019). Prediction and evaluation of the severity of acute respiratory distress syndrome following severe acute pancreatitis using an artificial neural network algorithm model. *HPB*, 21 (7): 891-897.
- Garg, P. K., & Mahapatra, S. J. (2021). Optimum Fluid Therapy in Acute Pancreatitis Needs an Alchemist. *Gastroenterology*, 160 (3): 655-659.
- Garg, P. K., & Singh, V. P. (2019). Organ Failure Due to Systemic Injury in Acute Pancreatitis. *Gastroenterology*, 156 (7): 2008-2023.
- Grech, V., & Rizk, D. E. E. (2018). Increasing importance of research metrics: Journal Impact Factor and h-index. *International Urogynecology Journal*, 29 (5): 619-620.
- Hu, F., Lou, N., Jiao, J., Guo, F., Xiang, H., & Shang, D. (2020). Macrophages in pancreatitis: Mechanisms and therapeutic potential. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131: 110693.
- Index, N. (2020). Ten countries with high-performing hubs of natural-sciences research. Nature Index 2020 Annual Tables. *Nature*. 580, S44. doi:10.1038/d41586-020-01229-4.
- Jo, S. I., Chang, J. H., Kim, T. H., Kim, C. W., Kim, J. K., & Han, S. W. (2019). Subsets associated with developing acute pancreatitis in patients with severe hypertriglyceridemia and the severity of pancreatitis. *Pancreatology*, 19 (6): 795-800.
- Kim, S. J., Kang, H., Kim, E. J., Kim, Y. S., & Cho, J. H. (2020). Clinical features and outcomes of hypertriglyceridemia-induced acute pancreatitis: Propensity score matching analysis from a prospective acute pancreatitis registry. *Pancreatology*, 20 (4): 617-621.

Kirkegård, J., Cronin-Fenton, D., Heide-Jørgensen, U., & Mortensen, F. V. (2018). Acute Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Nationwide Matched-Cohort Study in Denmark. *Gastroenterology*, 154 (6): 1729-1736.

Kirkegård, J., Mortensen, F. V., Heide-Jørgensen, U., & Cronin-Fenton, D. (2020). Predictors of underlying pancreatic cancer in patients with acute pancreatitis: a Danish nationwide cohort study. *HPB*, 22 (4): 553-562.

Koutroumpakis, E., Slivka, A., Furlan, A., Dasyam, A. K., Dudekula, A., Greer, J. B., Whitcomb, D. C., Yadav, D., & Papachristou, G. I. (2017). Management and outcomes of acute pancreatitis patients over the last decade: A US tertiary-center experience. *Pancreatology*, 17 (1): 32-40.

Lipinski, M., Rydzewska-Rosolowska, A., Rydzewski, A., Cicha, M., & Rydzewska, G. (2017). Soluble urokinase-type plasminogen activator receptor (suPAR) in patients with acute pancreatitis (AP) - Progress in prediction of AP severity. *Pancreatology*, 17 (1): 24-29.

Ma, R., Yuan, F., Wang, S., Liu, Y., Fan, T., & Wang, F. (2018). Calycosin alleviates cerulein-induced acute pancreatitis by inhibiting the inflammatory response and oxidative stress via the p38 MAPK and NF- κ B signal pathways in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105: 599-605. doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.080.

Masamune, A., Kikuta, K., Hamada, S., Tsuji, I., Takeyama, Y., Shimosegawa, T., Okazaki, K., Matsumoto, R., Kume, K., Miura, S., Takikawa, T., Hongo, S., Tanaka, Y., Sakai, T., Ueno, M., Unno, J., Toki, M., Nishimura, M., Kitamura, K., Kobashigawa, K., Ashida, K., Takahashi, K., Watanabe, T., Sato, Y., Satoh, Yoshida, A. N., Tanaka, K., Kondo, H., Suzuki, N., Sato, H., Mitoro, A., Minami, K., Iwasaki, E., Okuwaki, K., Mukai, T., Kudo, Y., Azuma, S., Takeda, Y., Setsuda, M., Tsuchida, K., Irisawa, A., Motoya, D., Shirahata, N., Iwata, K., Oza, N., Kawaguchi, Y., Hoshino, A., Hirano, A., Sakakihara, I., Watanabe, N., Funayama, H., Nakamura, Y., Yamamoto, T., Uchida, H. H., Iizawa, Y., Imamura, M., Inui, M., Yamamoto, K., Sato, S., Ishii, S., Yakushijin, S., Yamamoto, T., Masaka, K., Yoshida, T., Arizumi, T., Goto, M., Takenaka, M., Miyakawa, H. M., Otsuka, Y., Nishi, M., Suwa, K., Sakagami, J., Satoh, M., Koga, H., Takagi, T., Nagahama, M., Hatayama, K., Kaneko, N., Mori, M., Nakai, Y., Iwashita, Y., Iwatsuka, K., Hayashi, K., Terai, S., Kaneto, H., Nishikawa, T., Uchi, M., Honjo, M., Takagi, T., Mizukami, K., Tamura, T., Gushima, T., Sato, A., Shimizu, K., Aruga, Y., Nonogaki, K., Kaino, M., Iwashita, T., Tsuruoka, M., Miura, M., Hasegawa, H., Takai, T., Yokota, H., Fujisawa, T., Uetsuki, K., Kobayashi, T., Yamaji, N., Itoi, T., Muraki, T., Watanabe, T., Inatomi, O., Ushijima, T., Takehara, Y., Kawamura, H., Fukasawa, M., Hagiwara, H., Tamura, H., Moriya, T., Kuwatani, M., Kawaji, Y., Kamisawa, T., Abue, M., Fukunishi, M., Onoyama, H., Mochizuki, S., Sumimoto, K., Koyabu, M., Nishio, A., Sakao, M., Imamura, Y., Ohta, H., Nishimura, N., Shiihara, M., Anan, H., Motoya, M., Chiba, M., Deguchi, T., Kofunato, Y., Sawada, N., Katada, K., Matsumoto, S., Higashide, S., Okano, H., Ishida, M., Yamazaki, M., Tamura, N., Muraoka, T., Uza, N., Kodama, Y., Muro, S., Fujimori, N., Ikeda, T., Shimokawahara, N., Otsu, N., Yano, Y., Sugawara, S., Takaura, K., Ogura, Y., Furuuchi, T., Shibasaki M., & Kishimoto, M. (2020). Clinical practice of acute pancreatitis in Japan: An analysis of nationwide epidemiological survey in 2016. *Pancreatology*, 20 (4): 629-636.

Matta, B., Gougol, A., Gao, X., Reddy, N., Talukdar, R., Kochhar, R., Goenka, M. K., Gulla, A., Gonzalez, J. A., Singh, V. K., Ferreira, M., Stevens, T., Barbu, S. T., Nawaz, H., Gutierrez, S. C., Zarnescu, N. O., Capurso, G., Easler, J., Triantafyllou, K., Pelaez-Luna, M., Thakkar, S., Ocampo, C., de-Madaria, E., Cote, G. A., Wu, B. U., Paragomi, P., Pothoulakis, I., Tang, G. & Papachristou, G. I. (2020). Worldwide Variations in Demographics, Management, and Outcomes of Acute Pancreatitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 18 (7): 1567-1575.e2.

Miao, B., Qi, W. J., Zhang, S. W., Wang, H., Wang, C., Hu, L., Huang, G. W., Li, S. R., & Wang, H. (2019). miR-148a suppresses autophagy by down-regulation of IL-6/STAT3 signaling in cerulein-induced acute pancreatitis. *Pancreatology*, 19 (4): 557-565.

Mosko, J. D., Leiman, D. A., Ketwaroo, G. A., & Gupta, N. (2020). Development of Quality Measures for Acute Pancreatitis: A Model for Hospital-Based Measures in Gastroenterology. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 18 (2): 272-275.e2.

Mosztbacher, D., Hanák, L., Farkas, N., Szentesi, A., Mikó, A., Bajor, J., Sarlós, P., Czimmer, J., Vincze, Á., Hegyi, P. J., Eröss, B., Takács, T., Czakó, L., Németh, B. C., Izbéki, F., Halász, A., Gajdán, L., Hamvas, J., Papp, M., Földi, I., Fehér, K. E., Varga, M., Csefkó, K., Török, I., Farkas, H. P., Mickevicius, A., Maldonado, E. R., Sallinen, V., Novák, J., Ince, A. T., Galeev, S., Bod, B., Sümegi, J., Pencik, P., Dubravcsik, Z., Illés, D., Gódi, S., Kui, B., Márta, K., Pécsi, D., Varjú, P., Szakács, Z., Darvasi, E., Párniczky, A., & Hegyi, P. (2020). Hypertriglyceridemia-induced acute pancreatitis: A prospective, multicenter, international cohort analysis of 716 acute pancreatitis cases. *Pancreatology*, 20 (4): 608-616.

Munigala, S., & Yadav, D. (2016). Case-fatality from acute pancreatitis is decreasing but its population mortality shows little change. *Pancreatology*, 16 (4): 542-550.

Padma, T. V. (2016). India. *Nature*. 536 (7617): S26-S27. doi: 10.1038/536S26a.

Pasari, L. P., Khurana, A., Anchi, P., Aslam Saifi, M., Annaldas S., & Godugu C. (2019). Visnagin attenuates acute pancreatitis via Nrf2/NFκB pathway and abrogates associated multiple organ dysfunction. *Biomed Pharmacother*, 112: 108629. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108629.

Petrov, M. S., & Yadav, D. (2019). Global epidemiology and holistic prevention of pancreatitis. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 16 (3): 175-184. doi: 10.1038/s41575-018-0087-5.

Roberts, S. E., Morrison-Rees, S., John, A., Williams, J. G., Brown, T. H., & Samuel, D. G. (2017). The incidence and aetiology of acute pancreatitis across Europe. *Pancreatology*, 17 (2): 155-165.

Ruiz-Rebollo, M. L., Muñoz-Moreno, M. F., Mayo-Iscar, A., Udaondo-Cascante, M. A., & Nistal, R. B. (2019). Statin intake can decrease acute pancreatitis severity. *Pancreatology*, 19 (6): 807-812.

SCImago (2021). SJR - SCImago Journal & Country Rank. SJR - SCImago Journal & Country Rank: <https://www.scimagojr.com/countryrank.php>.

Sendler, M., van den Brandt, C., Glaubitz, J., Wilden, A., Golchert, J., Weiss, F. U., Homuth, G., De Freitas Chama, L. L., Mishra, N., Mahajan, U. M., Bossaller, L., Völker, U., Bröker, B. M., Mayerle J., & Lerch, M. M. (2020). NLRP3 Inflammasome Regulates Development of Systemic Inflammatory Response and Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndromes in Mice With Acute Pancreatitis. *Gastroenterology*, 158 (1): 253-269.e214.

Sternby, H., Hartman, H., Johansen, D., Thorlacius, H., & Regné, S. (2017). IL-6 and CRP are superior in early differentiation between mild and non-mild acute pancreatitis. *Pancreatology*, 17 (4): 550-554.

Stigliano, S., Sternby, H., de Madaria, E., Capurso, G., & Petrov, M. S. (2017). Early management of acute pancreatitis: A review of the best evidence. *Digestive and Liver Disease*, 49 (6): 585-594.

Stirling, A. D., Moran, N. R., Kelly, M. E., Ridgway, P. F., & Conlon, K. C. (2017). The predictive value of C-reactive protein (CRP) in acute pancreatitis – is interval change in CRP an additional indicator of severity? *HPB*, 19 (10): 874-880.

Sun, H., Tian, J., & Li, J. (2020). MiR-92b-3p ameliorates inflammation and autophagy by targeting TRAF3 and suppressing MKK3-p38 pathway in caerulein-induced AR42J cells. *International Immunopharmacology*, 88: 106691.

Szabo, F. K., Hornung, L., Oparaji, J. A., Alhosh, R., Husain, S. Z., Liu, Q. Y., Palermo, J., Lin, T. K., Nathan, J. D., Podberesky, D. J., Lowe, M., Fei, L., & Abu-El-Hajja, M. (2016). A prognostic tool to predict severe acute pancreatitis in pediatrics. *Pancreatology*, 16 (3): 358-364.

Tang, M. Y., Chen, T. W., Bollen, T. L., Wang, Y. X., Xue, H. D., Jin, Z. Y., Huang, X. H., Xiao, B., Li, X. H., Ji, Y. F., & Zhang, X. M. (2018). MR imaging of hemorrhage associated with acute pancreatitis. *Pancreatology*, 18 (4): 363-369.

Tarasiuk, A., & Fichna, J. (2019). Effectiveness and therapeutic value of phytochemicals in acute pancreatitis: A review. *Pancreatology*, 19 (4): 481-487.

Toldi, G., Bekő, G., Kádár, G., Mácsai, E., Kovács, L., Vásárhelyi, B., & Balog, A. (2013). Soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) in the assessment of inflammatory activity of rheumatoid arthritis patients in remission. *Clin Chem Lab Med*, 51 (2): 327-332.

Tollefson, J. (2018). China declared world's largest producer of scientific articles. *Nature*. 553: 390. doi: 10.1038/d41586-018-00927-4.

van den Berg, F. F., de Bruijn, A. C., van Santvoort, H. C., Issa, Y., & Boermeester, M. A. (2020). Early laboratory biomarkers for severity in acute pancreatitis; A systematic review and meta-analysis. *Pancreatology*, 20 (7): 1302-1311.

Vasconcelos, S. M., Sorenson, M. M., & Leta, J. (2007). Scientist-friendly policies for non-native English-speaking authors: timely and welcome. *Braz J Med Biol Res*, 40 (6): 743-747.

Vege, S. S., Horibe, M., Chari, S. T., Clemens, M. A., Loftus, C. G. & Enders, F. T. (2020). A single center randomized double blind controlled trial of pentoxifylline in acute pancreatitis: Challenges and opportunities. *Pancreatology*, 20 (8): 1592-1597.

Woolston, C., & Joana, O., (2019). When English is not your mother tongue. *Nature*, 570(7760):265-267. doi: 10.1038/d41586-019-01797-0.

Xiao, H., Huang, J.H., Zhang, X. W., Ahmed, R., Xie, Q. L., Li, B., Zhu, Y. M., Cai, X., Peng, Q. H., Qin, Y. H., Huang, H. Y., & Wang, W. (2017). Identification of potential diagnostic biomarkers of acute pancreatitis by serum metabolomic profiles. *Pancreatology*, 17 (4): 543-549.

Xie, Y., Zhang, C., & Lai, Q. (2014). China's rise as a major contributor to science and technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (26): 9437.

Yang, J., Zhou, Y., & Shi, J. (2020). Cordycepin protects against acute pancreatitis by modulating NF-κB and NLRP3 inflammasome activation via AMPK. *Life Sciences*, 251: 117645. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117645.

Yu, J. H., & Kim, H. (2014). Oxidative stress and inflammatory signaling in cerulein pancreatitis. *World J Gastroenterol*, 20 (46): 17324-17329.

Zhang, L., Zhang, J., Shea, K., Xu, L., Tobin, G., Knapton, A., Sharron, S., & Rouse, R. (2014). Autophagy in pancreatic acinar cells in caerulein-treated mice: immunolocalization of related proteins and their potential as markers of pancreatitis. *Toxicol Pathol*, 42 (2): 435-457.

Zhang, R., Deng, L., Jin, T., Zhu, P., Shi, N., Jiang, K., Li, L., Yang, X., Guo, J., Yang, X., Liu, T., Mukherjee, R., Singh, V. K., Windsor, J. A., Sutton, R., Huang, W., & Xia, Q. (2019). Hypertriglyceridaemia-associated acute pancreatitis: diagnosis and impact on severity. *HPB*, 21 (9): 1240-1249.

Zheng, J., Wu, J., Chen, J., Liu, J., Lu, Y., Huang, C., Hu, G., Wang, X., & Zeng, Y. (2016). Therapeutic effects of quercetin on early inflammation in hypertriglyceridemia-related acute pancreatitis and its mechanism. *Pancreatology*, 16 (2): 200-210. doi: 10.1016/j.pan.2016.01.005

Zheng, Z., Ding, Y.X., Qu, Y.X., Cao, F., & Li, F. (2021). A narrative review of the mechanism of acute pancreatitis and recent advances in its clinical management. *American journal of translational research*, 13 (3): 833-852.

Zhu, H., Huang, L., Zhu, S., Li, X., Li, Z., Yu, C., & Yu, X. (2016). Regulation of autophagy by systemic admission of microRNA-141 to target HMGB1 in l-arginine-induced acute pancreatitis in vivo. *Pancreatology*, 16 (3): 337-346.

Zimmermann, H. W., Koch, A., Seidler, S., Trautwein, C., & Tacke, F. (2012). Circulating soluble urokinase plasminogen activator is elevated in patients with chronic liver disease, discriminates stage and aetiology of cirrhosis and predicts prognosis. *Liver Int*, 32 (3): 500-509.

4.2 ARTIGO 2

A RAPID PROTOCOL TO ACUTE PANCREATITIS INDUCTION IN ZEBRAFISH MODEL

Kívia Vanessa Gomes Falcão

kivia.falcao@ufpe.br

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco – PE. Brasil.

Rafael David Souto de Azevedo

rafaeldavidbio@gmail.com

Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Universidade de Pernambuco – PE, Brasil.

Luiza Rayanna Amorim de Lima

luiza.amorim@upe.br

Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Universidade de Pernambuco – PE, Brasil.

Ranilson de Souza Bezerra

ransoube@uol.com.br

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco – PE, Brasil.

* Corresponding author: kivia.falcao@ufpe.br

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Centro de Ciências da Saúde.

Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária, Recife – PE. Brazil.

Laboratório de Enzimologia – LABENZ. +55 81 21268540 - 206

Resumo

A pancreatite aguda (PA) é uma desordem inflamatória que ocorre no pâncreas exócrino associado a lesão tecidual e necrose. Os modelos experimentais de PA usualmente são roedores, como ratos ou camundongos. Contudo roedores apresentam respostas patofisiológicas divergentes entre si, após o estabelecimento da PA. Os experimentos realizados para este manuscrito objetivaram padronizar um novo modelo de PA em zebrafish e validá-lo. Aqui fornecemos um protocolo para indução da PA no zebrafish a partir de injeções intraperitoneais de caeruleína sintética. Detalhes são fornecidos para o preparo de soluções, procedimentos prévios a injeção, técnica para aplicação de injeções e monitoramento da sobrevivência do animal. Realizamos posteriormente validação por meio de análises bioquímicas e histológicas do tecido pancreático. A dose administrada de caeruleína para a indução da PA foi de 10 µg/kg aplicada 4 vezes na região intraperitoneal. No estudo de validação histológica demonstrou a presença da necrose já nas primeiras 12h pós injeção acompanhada de excesso de grânulos de zimogênio no meio extracelular. Essas observações concordam com as relatadas em modelos convencionais de roedores. Padronizamos e validamos o modelo de PA em zebrafish. Este modelo pode ajudar em estudos pré-clínicos e clínicos de novas drogas para o tratamento da PA. Portanto, este novo modelo amplia as ferramentas de busca por estratégias preventivas e terapêuticas mais rápidas e eficazes para a PA.

Palavras-chave: *Danio rerio*, pancreatite aguda, caeruleína, patogênese, fisiopatologia.

Introdução

A pancreatite aguda (PA) é um processo inflamatório do pâncreas que apresenta como características patológicas a ativação precoce de enzimas digestivas e inflamação associada a necrose do parênquima pancreático e peripancreático (Cunha, 1994; Bradley, 1992; Habtezion et al., 2019). A PA está associada a complicações locais podendo evoluir rapidamente para a forma grave e sistêmica progredindo para falência de órgãos e a morte (Garg e Singh, 2019). Em situações em que há controle da PA, casos de recorrência ou evolução para pancreatite crônica são comuns. A incidência de casos de PA vem crescendo nos últimos anos e o número de mortes variam de 1 a 60 mortes por 100.000 pessoas/ano (Xiao, et al., 2016). Apesar dos avanços tecnológicos em seu estudo, os fatores moleculares e celulares que iniciam a promoção da PA ainda não estão claros e o tratamento para a PA ainda permanece como um desafio (Kambhampati et al., 2014). Recentemente, a discussão sobre homeostase de cálcio e abertura de poros de transição de permeabilidade mitocondriais figuram como novos mecanismos associados a patogênese (Lee e Papachristou, 2019).

Um número reduzido de estudos relacionadas a PA tem sido realizada *in vitro* utilizando a cultura de células. Contudo, tais abordagens possuem certa limitação por não refletir adequadamente a complexa interação tecidual pancreática. Na busca por entender os fatores clínicos relacionados aos mecanismos celulares subjacentes, os modelos animais têm sido bem-sucedidos na busca por novos agentes terapêuticos e na identificação de processos intracelulares que precedem lesões teciduais (Gorelick e Lerch, 2017; Lee and Papachristou, 2019). Afinal, a identificação precoce destes mecanismos celulares em pacientes humanos é um considerável desafio clínico. Ensaio experimentais *in vivo* podem ser executados por diferentes metodologias, tais como: administração de aminoácidos como L-arginina (Hegyí et al., 2004) e L-lisina (Zhu, Huang et al. 2016), ligadura cirúrgica do ducto biliar (Su et al., 2006), infusão de ácidos biliares (Aho et al., 1980) e por hiperestimulação de secretagogos como Colecistocinina (CCK-8) ou administração seu ortólogo molecular, a Caeruleína (Lampel e Kern, 1977). A caeruleína é um peptídeo análogo do CCK-8 que em doses regularmente repetidas e supra-fisiológicas pode causar PA ao estimular excessivamente a secreção pancreática exócrina. O modelo de PA induzida por secretagogos é o mais frequentemente utilizado por ser minimamente invasivo, com

alta reprodutibilidade e com aplicabilidade em várias espécies (Gorelick e Lerch, 2017). Dessa forma, o modelo de caeruleína em roedores foi estabelecido há várias décadas (Lampel e Kern, 1977; Niederau et al., 1985; Manso et al., 1992; Farrant et al., 2000; Zhang e Rouse, 2014) e é capaz de reproduzir lesões em roedores similares às observadas em casos clínicos de PA em humanos (Su et al., 2006).

Torna-se fundamental destacar que a resposta inflamatória e as vias fisiológicas envolvidas na evolução e estabelecimento da PA variam entre os animais modelo utilizados. Tal aspecto já foi discutido num estudo comparativo entre camundongos e ratos, após indução da PA por caeruleína, em que a caspase-3 efetora e a caspase-9 e caspase-8 iniciadoras foram fortemente ativadas durante a PA em rato, mas não no camundongo (Ulmasov et al., 2013). Além disso, ratos e camundongos diferem quanto ao tempo para ativação de zimogênios, grau de inflamação e padrão de morte celular (Gorelick e Lerch, 2017). Logo, novos métodos em modelos animais tornam-se necessários para aprimorar a compreensão sobre a fisiopatologia da PA em comparação aos estudos documentados e validar os seus resultados.

O *Danio rerio* (zebrafish) é um vertebrado que adquiriu destaque em investigações sobre diversas condições patológicas (Rosa et al., 2008; Leite et al., 2012; Nik et al., 2014; Lleras-Forero et al., 2020). Várias particularidades fomentaram o uso desses pequenos teleósteos, em particular seu baixo custo e fácil manutenção (Bauer et al., 2021), fertilização externa e desenvolvimento fora do corpo materno (Kimmel, Ballard et al., 1995), transparência óptica durante os estágios embrionários (Lieschke et al., 2007), grande número de descendentes e rápido desenvolvimento (Cassar et al., 2020), capacidade de regeneração de vários tecidos biológicos tais como: ósseo (Sehring e Weidinger, 2020), renal (Diep et al., 2011; Kroeger e Wingert, 2014), cardíaco (Poss et al., 2002; Brezitski et al., 2021) e nervoso (Ghosh e Hui, 2016); similaridade com o genoma de referência humano (Howe et al., 2013). Assim, o zebrafish emergiu como um excelente modelo experimental para estudos comportamentais, genéticos, toxicológicos e fisiológicos (Niklaus et al., 2017; Cassar et al., 2020; Linet et al., 2020; Dasgupta et al., 2022). O que inclui estudos sobre a morfofuncionalidade do pâncreas do zebrafish. O pâncreas do zebrafish possui elevadas similaridades com o pâncreas humano no que diz respeito a diferenciação celular, mecanismos moleculares funcionais, captação de glicose e, até mesmo,

surgimento de diabetes (Kimmel and Meyer, 2016). Além disso, o pâncreas do zebrafish possui uma valiosa capacidade de regeneração (Prince et al. 2017) aliada a facilidade para monitoramento não invasivo *in vivo* do pâncreas endócrino e exócrino (Faraj et al. 2022). Portanto, o zebrafish se tornou um modelo útil para o entendimento de aspectos morfofuncionais e patológicos do tecido pancreático.

Neste manuscrito foi estabelecido um protocolo para indução da PA em zebrafish com caeruleína sintética. Estudos da PA em modelos alternativos como zebrafish podem ajudar a superar deficiências metodológicas comuns com modelos de roedores.

Métodos

Cuidados e manutenção em animais

Uma correta descrição das condições experimentais e de manutenção de modelos experimentais é relevante em um contexto translacional. Aqui todos os cuidados com animais e técnicas experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE (Processo nº 0042/2021). Foram adquiridos zebrafish adultos (12 months old) do tipo selvagem obtidos por fornecedor local (Recife Aquários, Recife-PE, Brazil). Os animais foram cuidadosamente transportados para o Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE imediatamente após a aquisição. Antes de qualquer técnica experimental, os animais foram aclimatados as condições laboratoriais por 40 dias.

Para aclimação e manutenção os animais foram aleatoriamente distribuídos em aquários de 20 L de vidro em uma densidade de 4 animais/L. Os aquários estavam acoplados a um sistema com recirculação semifechado com filtração a jusante/UV sem nenhum tipo de enriquecimento ambiental. As condições ambientais foram controladas com temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, e um ciclo claro/escuro de ~14/10 h. Todos os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com a dieta D-50 plus (Tropical®) as 9h e 17h pelo alimentador automático (Resun af-2009d) 7 dias por semana. Para a indução da PA somente foram incluídos exemplares machos adultos saudáveis que foram mantidos com, ao menos, uma fêmea por aquário antes de serem utilizados. Não foram incluídos exemplares machos pequenos (comparados ao tamanho usual da espécie). Para tentativa de indução da PA os animais foram alocados

aleatoriamente em dois grupos experimentais ($n = 48$), sendo um grupo controle que recebeu apenas salina, um grupo recebeu caeruleína 10 $\mu\text{g/mL}$, quadro 1. O experimento foi conduzido em três replicações independentes.

Quadro 1. Lista de equipamentos, reagentes e materiais utilizados no experimento.

Equipamentos	Reagentes	Materiais
Balança analítica (Gehaka, Ref. AG200)	Caeruleína (Sigma-Aldrich-Merck, cat. no. C9026, Brasil)	Rede de pesca
Automatic feeder (Resun af-2009d)	Solução fisiológica (NaCl 0,9%) (Fresenius Kabi, Brasil)	Becker
Micrótomo rotativo manual (Lupetec, Ref. MRP2015)	MS-222 (Sigma-Aldrich-Merck, cat. no. A5040, Brasil)	Pinça
Centrífuga Digital (Kasvi, Ref. K14-0815C)	Formaldeído (Sigma-Aldrich-Merck, cat. no. 252549-1L, Brasil)	Pipeta
Dispensador de Parafina (Lupetec, Ref. DP2010)	Heparina (Sigma-Aldrich-Merck, cat. no. 9041-08-1, Brasil)	Tesoura cirúrgica
Placa aquecida (Lupetec, Ref. PA2012)	BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, cat. no. 23225, Brasil)	Bisturi cirúrgico
Histotécnico com retardo (Oma, Ref. Dm40)	Hematoxilina de Harris (Easypath Diagnósticos, cat. no. EP-11-20571, Brasil)	Gaze hidrófila
Banho-maria para cortes histológicos (Medite, Ref. TFB55)	α -Amilase (In Vitro Diagnóstica Ltda, Cat. no 024A, 025A, 027, Brasil)	Luva estéreis
Microscópio Optico com câmara acoplada (Motic, Ref. BA310E)	Lipase (Bioclin Quibasa Química Básica Ltda, Cat. no. K025, Brasil)	Seringa de insulina
	Xileno PA (Química moderna indústria e comercio eireli, cat. no. 60REQMO000302, Brasil)	Esponja
	Álcool Etílico Absoluto (Química moderna indústria e comercio eireli, cat. no. QMA00001123401000, Brasil)	Cassete para histologia
	Entellan (Merck Millipore, cat. no. 100869, Brasil)	Lâmina histológica
	Eosina A (Merck Millipore, cat. no. 102439, Brasil)	Lamínula
	Parafina (Merck Millipore, cat. no. 107151, Brasil)	Lápis
		Navalha para microtomia de baixo perfil.
		Molde de metal para histologia.
		Placa de Pétri.
		Ração Tropical D-50 plus
	Aquários de 5 L	
	Tubos estéreis	
	Tubos de centrífuga	
	Recipientes estéreis com tampa de 1 L	

Fonte: Autores (2023)

Detalhes para indução da PA incluem:

- 1- Para os experimentos: utilize zebrafish adultos machos, selvagens, com comprimento padrão de $3,5 \pm 0,5$ cm e peso de $0,4 \pm 0,1$ g.
- 2- Vinte e quatro horas antes da aplicação das injeções de caeruleína, reserve os animais em um aquário separado dos demais mantendo os mesmos em jejum, a fim de esvaziar todo o conteúdo intestinal. Os animais devem ser mantidos nas mesmas condições de manutenção visando minimizar condições estressantes.

Preparação dos reagentes

- Solução de caeruleína

- 1- Prepare uma solução estoque: dissolver 1 mg de caeruleína (Sigma-Aldrich, Brasil) em 1 mL de NaCl 0,9%. Durante o manuseio da caeruleína utilize luvas que devem ser inspecionadas antes do uso.
- 2- Prepare uma solução de trabalho: retire 100 μ L da solução estoque e dissolva em 9900 μ L de NaCl 0,9% para preparar uma solução final de 10 μ g/mL de caeruleína.
- 3- Separe em alíquotas de 10 μ L, solução de trabalho que será usada durante cada injeção.
- 4- Armazene todas as alíquotas das soluções a -20° C até a realização dos experimentos. Estas alíquotas se mantem estáveis por alguns meses em pH 7,0.

- Solução de MS-222

- 1- Prepare uma solução de 150 mg/mL de MS-222 dissolvida em 2 mL de água destilada. Este reagente deve ser manuseado com luvas que devem ser inspecionadas antes do uso. Também é importante proteger os olhos e uso de proteção respiratória em caso de formação de pós. Este produto é tóxico em ambientes aquáticos.
- 2- Tampone a solução anterior com PBS 0,5 M até o pH chegar a 7,0.
- 3- Separe alíquotas de 1 mL e reserve no freezer a temperatura de 3° C. Estas alíquotas se mantem estáveis por meses sob condições adequadas de armazenamento.

- Solução de formalina a 10%

- 1- Prepare uma solução de 100 mL de formalina (37%) dissolvida em 900 mL de água destilada, 4g de fosfato de sódio monobásico (anidro) e 6,5 g de fosfato de sódio dibásico (anidro).

2- Homogenize tudo e reserve em um recipiente bem vedado.

Pesagem do zebrafish

1- Encha um béquer com água cerca de 1/3 do seu volume e transfira para uma balança analítica. Utilize a mesma água da manutenção dos animais.

2- Tare o valor na balança após o equilíbrio.

3- Com a rede de pesca recolha o peixe após o seu período de jejum. Balance suavemente para retirar o excesso de água e transfira o peixe para o béquer.

4- Pese o peixe e anote o valor apresentado.

5- Recolha e transfira o peixe para um aquário limpo.

6- Calcule o volume de injeção de cada peixe com base no peso 0,02mL de caruleína/g.

Preparação para pré-injeção

1- Na face plana da esponja, faça um corte no centro de aproximadamente 10-15 mm de profundidade.

2- Coloque a esponja em uma placa de Petri.

3- Descongele as alíquotas da solução de trabalho de caeruleína.

4- Descongele as alíquotas da solução de MS-222.

5- Abra a embalagem da seringa de insulina e retire o vácuo da seringa a fim de facilitar a aspiração e aplicação da injeção.

6- Com a seringa de insulina e agulha, aspire 1 UI da solução de trabalho já descongelada.

Anestesia

1- Em um Becker, adicione a alíquota de MS-222 e dissolva em 200 mL de água potável. Aguarde a completa dissolução do anestésico na água.

2- Com uma rede de pesca, transfira o zebrafish para o Becker com a MS-222 dissolvida.

3- Monitore o comportamento do zebrafish com a pinça em suas nadadeiras, observando os movimentos das guelras ficarem lentos até a natação parar e o peixe não responder mais a nenhum manuseio da pinça.

Injeção intraperitoneal

A aplicação das injeções intraperitoneais seguiu a metodologia descrita por Stewart et al. (2011), e a indução da pancreatite aguda, foi baseada na metodologia de Niederau et al. (1985) desenvolvida para roedores, com adaptações. Para este modelo animal, a indução consistiu na aplicação de quatro injeções intraperitoneais de caeruleína sintética dissolvida em NaCl 0,9%, nas concentrações 10 µg/ml, com intervalos de uma hora entre as aplicações. Para realizar a validação deste protocolo, também foi realizada a administração de 4 injeções de salina no grupo controle.

1- Transferir imediatamente o peixe anestesiado para a placa de pétri com esponja embebida de solução fisiológica. Certificar que ele esteja com ventre para cima e que as brânquias estejam envolvidas pela esponja.

2- Com o bisel voltado para cima inserir a agulha na linha média ventral, posterior à nadadeira pélvica e anterior ao ânus, conforme indicado na Fig. 1. A ponta da agulha deve ser inserida superficialmente.

3- Injetar todo líquido pressionando o dispositivo superior e retirar imediatamente a agulha.

4- Devolver imediatamente o peixe ao seu aquário para recuperação. Observar os movimentos das guelras retornarem novamente.

5- Esperar 1 h até a aplicação da próxima injeção.

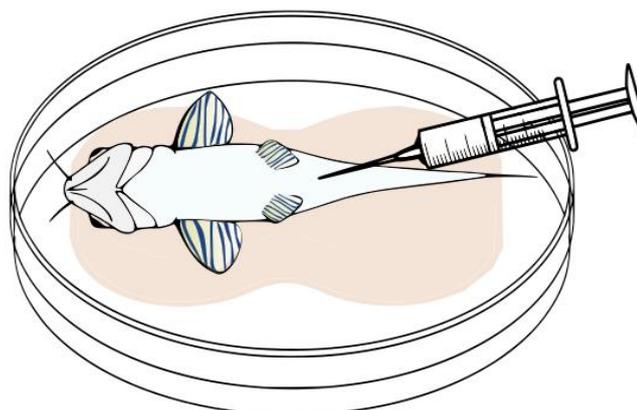
6- Repetir a etapa 3.3 e 3.4 três vezes.

Nota: Para melhor visualização da região para aplicação das injeções, o procedimento pode ser realizado utilizando uma lupa ou um estereomicroscópio óptico.

Nota: Durante a aplicação da injeção introduza a seringa com ângulo de 30°, de forma que apenas o bisel fique dentro do peritônio do animal. Inserir toda a agulha corre o risco de perfurar o intestino devido a sua localização. Qualquer sinal de sangue ou outro fluido indica posicionamento incorreto.

Nota: Para o grupo controle, também foi utilizado o valor de 10 UI para aplicar as injeções da solução fisiológica 0,9%.

Figura 1. Ilustração do local para aplicação da injeção intraperitoneal no zebrafish.



Fonte: Autores (2023)

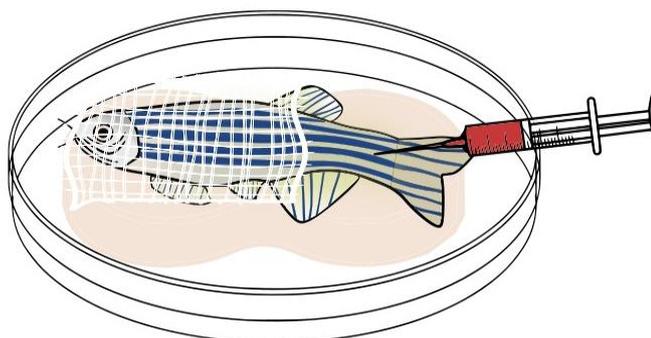
Coleta Sanguínea

- 1- Com uma seringa de insulina e agulha aspire 1 UI de heparina e reserve.
- 2- Repita a etapa 3.5 e transfira imediatamente o peixe anestesiado para a placa de pétri com esponja embebida de solução fisiológica.
- 3- Posicione o animal com sua lateral direita voltada para a esponja e a sua lateral esquerda voltada para cima.
- 4- Cubra o peixe com uma gaze embebida de solução fisiológica, deixando apenas a cauda fora da gaze.
- 5- Com o bisel voltado para cima inserir a agulha com heparina na linha média entre a barbatana anal e a barbatana caudal, para alcançar a artéria caudal, conforme indicado na Fig. 2. Cuidado para o bisel não atingir a coluna vertebral, caso isso ocorra, retraia a agulha.
- 6- Aspire suavemente o sangue da artéria caudal.
- 7- Com cuidado, retire a agulha da seringa e rapidamente despeje o sangue coletado em um microtubo e imediatamente homogenize gentilmente com uma pipeta para evitar hemólise.
- 8- Leve o microtubo para a centrífuga e centrifugue por 10 minutos a 3.500 rpm a temperatura ambiente.
- 9- Com uma pipeta colete o soro e transfira para um novo microtubo. Reserve para posterior análise bioquímica.

Nota: A quantidade de sangue coletada irá depender do tamanho do peixe, variando normalmente de 5 a 20 μL . É preciso cautela para não remover todo o sangue do animal.

Nota: Se as análises enzimáticas forem realizadas no mesmo dia da coleta, armazene o soro em gelo até o início da análise. Caso as análises forem realizadas posteriormente, armazene em temperatura de 12° C por no máximo três dias. Contudo, é preferível que as análises sejam realizadas no mesmo dia da coleta.

Figura 2. Ilustração do local para coleta sanguínea no zebrafish.



Fonte: Autores (2023).

Eutanásia

- 1- Repita o procedimento 3.5 e em seguida realize a luxação na medula espinhal.
- 2- Recolha o pâncreas e transfira para um recipiente estéril com tampa, adicione a formalina 10% na proporção de volume amostra/fixador = 1:10.
- 4- Reserve até a realização da histologia.

Nota: Para obter detalhes completos sobre a técnica de eutanásia usadas neste manuscrito, consulte o documento original (Matthews e Vargas, 2012).

Nota: O material deve permanecer no fixador por aproximadamente 24h.

Análises bioquímicas

A avaliação da PA pode ser verificada através da dosagem sanguínea de enzimas como Amilase, Lipase. Para este protocolo a dosagem de amilase sérica foi quantificada usando os kits colorimétricos de α -amilase, lipase e proteínas totais.

Nota: A amilase, lipase e proteínas totais do soro foram medidos pelos kits de ensaio de acordo com as instruções do fabricante. Para obter detalhes sobre as etapas realizadas no item 3.8, consulte a bula fornecida pelos fabricantes.

Histologia

- 1- Com uma pinça, recolha a amostra da formalina e deposite em cassetes identificando-os com lápis. Em seguida incube em PBS pH 7.2 para recuperação da homeostase celular.
- 2- Realize a desidratação da amostra com imersão em álcool etílico 70%, 80% por 10 minutos cada e Álcool etílico 95% e 100% por 20 minutos cada.
- 3- Realize a clarificação da amostra com imersão em xilol I e xilol II por 20 minutos cada.
- 4- Realize a inclusão da amostra na parafina com imersão em parafina I e parafina II, a 56°C, por 30 minutos cada.
- 5- Coloque a parafina em um molde de metal.
- 6- Com uma pinça, retirar a mostra do cassete e posicione a amostra.
- 7- Fazer os cortes de 5 micrômetros utilizando micrótomo rotativo.
- 8- Com uma pinça, transfira a fita e coloque em banho maria a 45° C, em seguida pegue o corte com a lâmina previamente preparada quimicamente, e a deposite na placa aquecida a 60° C até a fixação do tecido.
- 9- Realize a desparafinização com imersão em xilol I por 30 min a 65 °C e em e xilol II por 15 minutos a temperatura ambiente.
- 10- Realize a hidratação com imersão em Álcool etílico 100%, 80%, 70% e água por 5 minutos cada.
- 11- Realize a coloração com imersão em Hematoxilina de Harris por 5 minutos, lavagem em água corrente por 5 minutos, imersão em eosina por 5 minutos e lavagem em água corrente por 5 minutos.
- 12- Realize a desidratação com imersão em Álcool etílico 70%, 80% e 100%.
- 13- Realize a fixação com imersão em xilol I e xilol II por 5 minutos cada.
- 14- Monte as lâminas com 1 gota de Etellan® e lamínula.
- 15- Analise as lâminas no microscópio óptico.

Análises estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o software estatístico Prism. O teste de Diferença Honestamente Significativa (HSD) da TUKEY e os métodos ANOVA de uma via foram usados para comparar as médias de várias amostras. Comparações múltiplas entre diferentes tratamentos foram realizadas dentro de cada grupo de dose usando o teste t de Student em $p < 0,05$.

Resultados

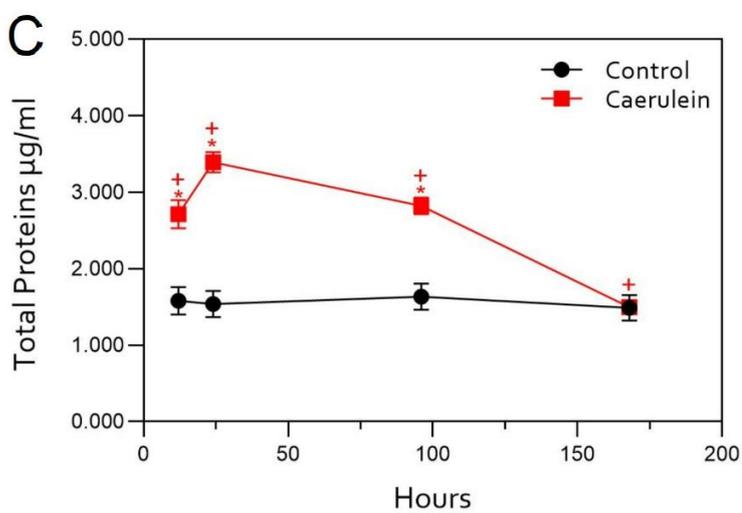
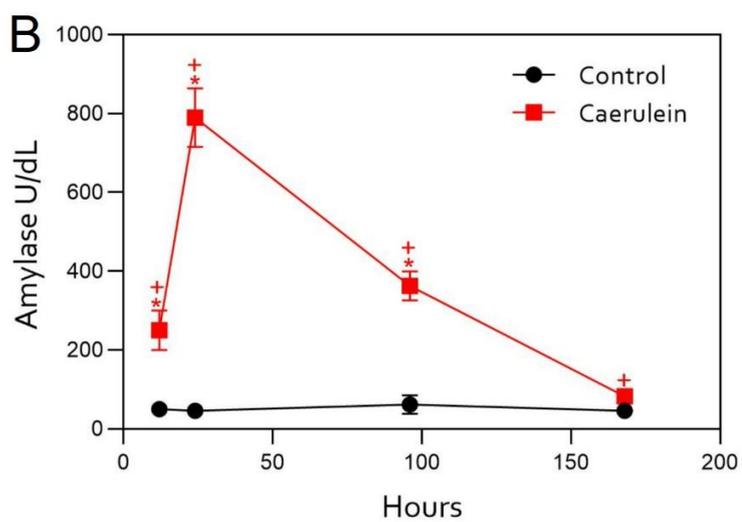
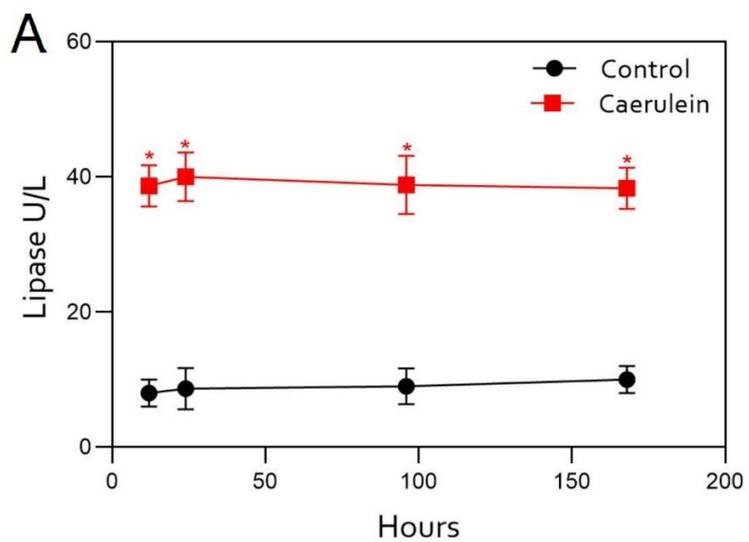
Para testar o zebrafish como modelo para indução da PA, o mecanismo de estimulação supra máxima de secretagogos foi usado. Experimentos iniciais infundindo 4x e 5x injeções de 5 µg/mL caeruleína no zebrafish não mostraram qualquer aumento nas proteínas totais, amilase sérica ou lipase em comparação com o controle infundido com solução salina 0,9% (dados não mostrados). Em seguida, foi injetado o dobro da concentração inicial testada de caeruleína em 4x injeções de 10 µg/mL caeruleína, obtendo êxito nos resultados. Esta dose foi, portanto, escolhida para estudar o curso temporal da PA induzida por caeruleína neste modelo animal. Entende-se, portanto, que apenas doses excessivas de caeruleína foram capazes de causar a alteração celular e aumento das enzimas séricas. Em ratos, o estudo pioneiro sobre pancreatite também relatou que apenas altas doses de caeruleína causaram alterações bioquímicas e histológicas após infusões 5x 10⁻⁶ g/kg/h de caeruleína já nas doses menores estudadas não obteve alterações (Lampel e Kern, 1977).

Após infusão de 4 injeções de caeruleína nos grupos testes, nenhuma mortalidade foi observada durante a indução aguda deste estudo. Seguindo a metodologia de Niederau et al. (Niederau et al., 1985) para avaliação temporal do processo inflamatório e cura da PA foi coletado as análises bioquímicas e histológicas nos períodos de 12 h, 24 h, 96 h e 168 h após as injeções. Os ensaios foram realizados em triplicata performado com grupos de 4 animais para cada tempo e grupo testado. O grupo controle (48 animais) foram submetidos a injeções de solução salina 0,9% e o grupo da caeruleína (48 animais) submetidos as injeções de caeruleína. As análises bioquímicas da amilase, lipase e proteínas totais foram realizadas com pool de amostras sanguíneas obtidas após a coleta 20 µL de sangue/por peixe dos grupos. As análises também foram feitas em triplicata utilizando testes colorimétricos em

pequena escala. Os níveis enzimáticos séricos entre os grupos foram comparados e os resultados apresentaram significância em $p < 0,0001$.

Os resultados da lipase sérica após a indução da PA sumarizados na figura 3 (gráfico A) foram expressivos, com valores médios estatisticamente diferentes ($p < 0,0001$) em comparação com o controle nos períodos de 12h, 24h, 96h. A lipase apresentou aumento (aproximadamente 30x) da atividade enzimática no sangue já nas primeiras 12h, mantendo-se constante até a 168 h. A lipase apresentou diferença significativa entre os grupos teste e o grupo controle ($p < 0,0001$), entretanto não apresentou entre os grupos testes de caeruleína nos períodos estudados. Os níveis séricos de amilase aumentaram significativamente no zebrafish 12 h após as injeções (gráfico B), obtendo seu pico máximo em 24h com aumento superior a 500x da atividade normal enzimática. Posteriormente é observado a diminuição da amilase sanguínea, recuperando os valores de controle em 168h (7 dias), não observando diferença estatística. A dosagem de proteínas totais apresentou o perfil gráfico semelhante ao da amilase, com aumento crescente da atividade até 24h e posteriormente redução até recuperar os valores semelhantes ao controle em 168h (gráfico C). Houve diferenças estatísticas ($p < 0,0001$) em comparação com o controle nos períodos de 12h, 24h, 96h, entretanto não ocorreu em 168 h pós injeção. Todas as análises bioquímicas sanguíneas (amilase, lipase e proteínas totais) não mostraram diferença significativa entre os grupos controles testados nos períodos estudados.

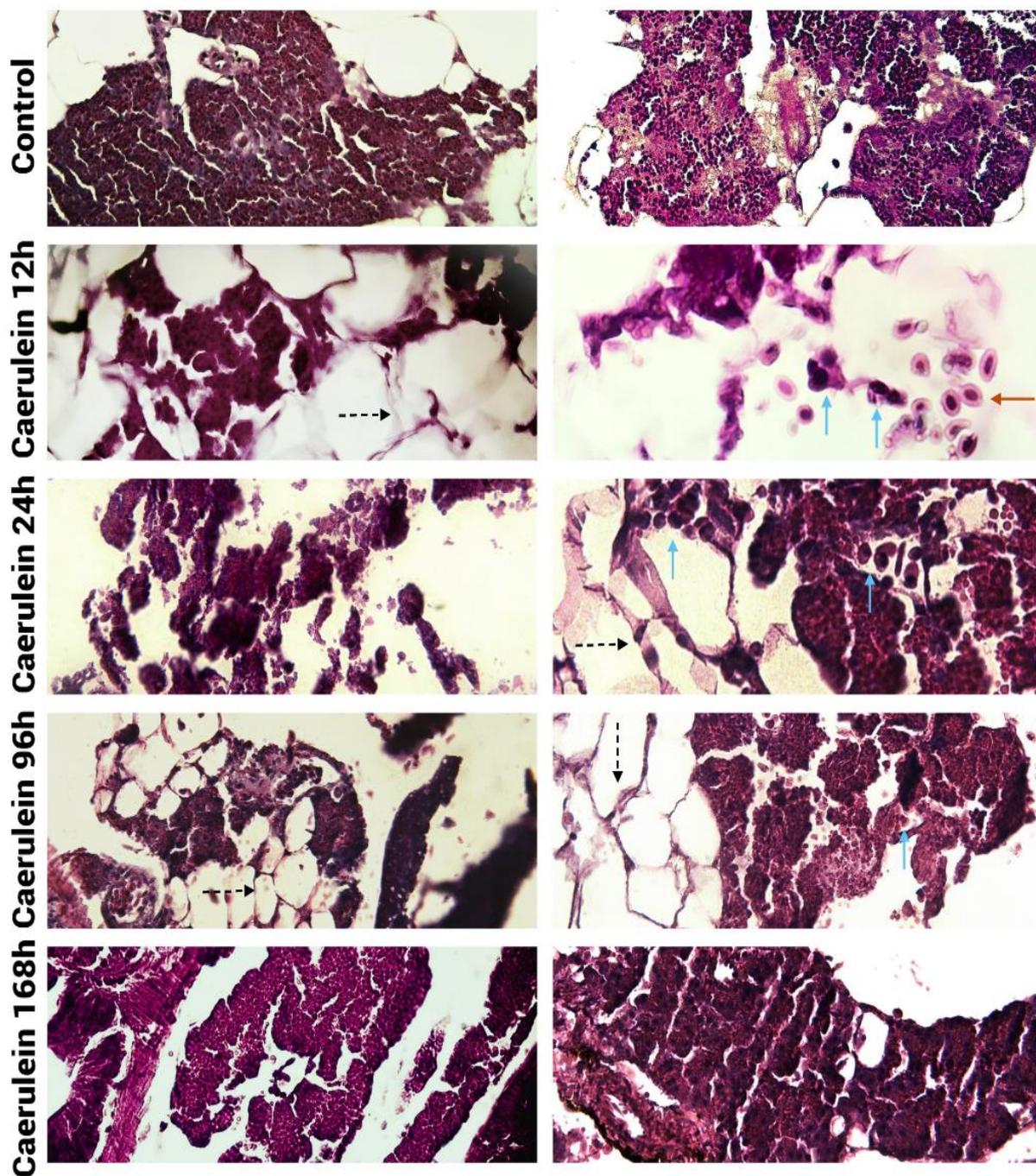
Figura 3: Gráficos dos níveis séricos de lipase (A), amilase (B) e proteínas totais (C) em zebrafish após a indução da PA com caeruleína 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (grupo teste) e NaCl 0,9% (grupo controle) nos períodos de 0h, 12h, 24h, 96h e 168h. (*) representa valores médios que são estatisticamente diferentes em $p < 0,0001$ em comparação com o controle no período testado. (+) representa valores médios que são estatisticamente diferentes em $p < 0,0001$ entre os grupos testes (caeruleína) no período testado. Os ensaios foram realizados em triplicata com grupos de 4 animais para cada tempo e substância testada.



Fonte: Autores (2023).

A avaliação histológica foi usada para identificar o dano pancreático agudo no zebrafish induzido pela caeruleína, a Figura 4 mostra a aparência estrutural das células pancreáticas exócrinas. No grupo controle a infusão de soro fisiológico não alterou a concentração de grânulos de zimogênio e nem a estrutura das células acinares. Observações da microscopia de luz para o grupo controle revelaram ácinos pancreáticos íntegros, com citoplasma levemente eosinofílico e presença visível dos grânulos dispersos no citoplasma. Já nos animais submetidos as caeruleína em 12 h pós injeções foi observado degeneração nuclear e celular, presença de necrose gordurosa (setas pretas), necrose hemorrágica com alta concentração de hemácia (seta vermelha), necrose com a presença de picnose, cariorrexe, cariólise e perda da granulosidade citoplasmática e sua eventual dispersão pelo espaço extracelular. Em 24 h o tecido apresentou o grau máximo de necrose evidenciada pela hipercromasia tecidual e aumento significativo do número de zimogênios e de adipócitos no tecido pancreático. Nesse período observa-se crescimento do processo inflamatório com maior número de eosinófilos no tecido (seta azul) e a sua presença mantém-se também durante as 96 h. Apesar da necrose gordurosa e células inflamatórias persistir após 4 dias de injeções (96 h) é possível observar a recuperação gradativa do tecido pancreático pela organização celular voltando a se agrupar em ácinos pancreático, com citoplasma eosinofílico e presença visível dos grânulos no citoplasma e não mais dispersos no espaço extracelular. Em 168 h o tecido pancreático volta a sua normalidade com ácinos pancreáticos íntegros, citoplasma levemente eosinofílico e grânulos dispersos no citoplasma.

Figura 4: Microscopia ótica de alterações histológicas do pâncreas do zebrafish no curso de tempo induzidas por ceruleína. O controle apresenta histologia pancreática normal após 4 injeções de solução salina. Note a organização tecidual acinar organizada e ausência de células inflamatórias ou necrose. Após 12 h da administração das 4 injeções de caeruleína (10 µg/mL) a arquitetura acinar é perdida apresentando infiltrado inflamatório (seta azul), hemácias (seta vermelha) e necrose gordurosa (seta preta). Em 24 h a necrose gordurosa e inflamação intersticial estão presentes em maior grau do que nas 12 h. Em 96 h o tecido apresenta recuperação inicial voltando a se reagrupar em ácinos e em 168 h o pâncreas volta ao seu estado normal com células íntegras e ausência de necrose e inflamação. (Coloração: Hematoxilina e Eosina, Magnificação: 400x, Escala: 100 µm).



Fonte: Autores (2023).

Discussão

Trabalhos anteriores demonstraram que grandes doses de caeruleína podem induzir PA em modelos consagrados como ratos e camundongos (Zhang et al., 2014; Ozer et al., 2015; Xiong et al., 2019; Lv e Jin, 2019; Yang et al., 2022). Como exemplo,

Ly e Jin, 2019 utilizaram seis doses de 50 mg/kg caeruleína em C57BL/6 mice, Yang et al. 2022 utilizou dez injeções de 200 µg/kg em ICR ratos. Uma vez que o presente estudo demonstrou as primeiras evidências do zebrafish como animal modelo para PA induzida por caeruleína, torna-se evidente que dosagens menores foram efetivas para indução da PA. Isto inclui um tempo menor para indução. Como exemplo, Ammer-Herrmenau et al. 2022 precisou de oito doses diárias de caeruleína por dois dias para indução da PA em um SPARC knock-out mice (Ammer-Herrmenau et al. 2022). Além disso, quando as doses usualmente utilizadas em roedores são ajustadas para humanos se tornam tóxicas devido a um aumento colinérgico excessivo somente comparável ao veneno do escorpião (Gorelick and Lerch, 2017). Portanto, o uso do zebrafish como modelo para PA traz celeridade metodológica e potencial para estudos utilizando múltiplos modelos para entendimento da uma patologia complexa.

A quantidade sérica de amilase, lipase e proteínas totais do zebrafish, nos grupos tratados com caeruleína aumentaram expressivamente em comparação com aqueles dos grupos de controle ($p < 0.0001$). Neste estudo os valores enzimáticos encontrados pelo grupo controle submetidos a injeções de solução salina apresentavam dentro dos valores de normalidade aplicados a humanos, visto que os níveis normais de amilase e lipase em humanos podem variar de 30-110 U/L e 0-60 U/L, respectivamente (Aljomah e Hammami, 2019). A dosagem de lipase e amilase na PA em humanos comportam-se de forma diferente, os níveis de lipase sérica aumentam em até três vezes o seu limite superior normal e atingem o pico em 24 horas, apresentando uma janela diagnóstica maior do que a amilase. Sua diminuição aos níveis normais em pacientes internados com PA ocorre em torno de 8 a 14 dias (Rompianesi et al., 2017), permitindo assim que seja um biomarcador diagnóstico útil principalmente nos estágios mais tardios da doença (Ismail e Bhayana, 2017). Da mesma forma, os resultados da lipase apresentados por este estudo no zebrafish (figura 3) também demonstrou continuidade dos valores elevados durante a PA em torno de 168 h, assim como nos humanos.

É considerado diagnóstico da PA em humanos quando a dosagem da amilase sérica é superior em pelo menos três vezes o limite máximo normal, sua atividade aumenta nas primeiras 12 horas com pico em 24 h retornando à normalidade em aproximadamente cinco dias (Matull et al., 2006; Rompianesi et al., 2017). Semelhantes aos humanos, na PA estudada no zebrafish também foi observado

elevado valor da atividade enzimática da amilase como diagnóstico para PA nos primeiros dias da doença, o resultado apresentado pelo gráfico de proteínas totais no zebrafish acompanha o padrão da amilase, indicando assim que a queda do quantitativo de proteínas no sangue após 24 h é resultado da diminuição da amilase sanguínea observada no mesmo período estudado.

Um dos desafios atuais para compreensão completa da PA em humanos é a realização de histopatologia. Usualmente esta técnica não é empregada por apresentar riscos de exacerbação da doença durante a realização da biópsia pancreática e por não ser um método usual de diagnóstico há poucos relatos da histopatologia na PA humana (Foster, 2014). A caracterização da histologia humana na PA é evidenciada por infiltrado inflamatório celular, necrose tecidual intersticial, necrose acinar, edema no pâncreas com focos de necrose gordurosa. Todos os achados histológicos na PA humana também estavam presentes na histologia do zebrafish submetidos as injeções com caeruleína. Resultados histológicos similares por indução da PA também foram identificados em outros animais estudados como os roedores (Lampel e Kern, 1977; Tani et al., 1987; Norkina et al., 2006; Cao et al., 2013; Zhang et al., 2014), coelho, gambás e gatos (Hirano et al., 1991; Lerch et al., 1992, Wedgwood et al., 1996). Os resultados apresentados neste protocolo estão em consonância os achados em outros animais estudados e com PA em humanos, dessa forma pode-se considerar o zebrafish como um modelo animal satisfatório para estudar PA.

O estudo da pancreatite em modelos animais ainda é uma área que precisa ser explorada. Embora o modelo de roedores seja o mais usual em estudos relacionados a PA, roedores apresentam diferenças anatômicas, na quantidade de receptores CCK no pâncreas e na atividade enzimática em comparação ao pâncreas humanos (Owyang e Logsdon, 2004; Gorelick e Lerch, 2017). Diferenças essas reconhecidamente imprescindíveis para elucidação da doença já que uma das formas de avaliação da lesão pancreática, junto a histologia, se dá pela quantificação das enzimas pancreáticas do soro, como amilase e lipase (Zhan et al., 2016). Além disso, estudos comparativos de PA induzida em ratos e camundongos apontaram diferenças no tempo de ativação dos zimogênios, no padrão de morte celular e no grau de inflamação com a expressão exacerbada de caspases efetora e iniciadoras piorando o grau de necrose em ratos, já nos camundongos permaneceram intactas

(Mareninova et al., 2006; Ulmasov et al., 2013). Devido imprecisão clínica dos roedores em reproduzir fielmente a doença humana, novos modelos animais clinicamente relevantes são urgentemente necessários para avaliação de tratamentos clínicos e intervenções terapêuticas da PA (Zhan et al., 2016). Estudos discutem a eficácia em utilizar múltiplos modelos em preparações experimentais (Gorelick e Lerch, 2017). Dessa forma, o zebrafish pode surgir como uma alternativa para o estudo da PA *in vivo*, os resultados apresentados por esse manuscrito ajudaram a estudar a PA por refletir mais o quadro clínico em humanos mais semelhante, uma vez que os sinais clínicos habituais presentes na PA em humanos como a morte celular acinar por apoptose, necrose e autofagia; perda parênquima, hemorragia, infiltração celular inflamatória (Zhan et al., 2016) também foram detectados no zebrafish neste estudo, através da indução da PA por caeruleína.

O emprego do zebrafish em pesquisas surgiu como uma alternativa entre os ensaios *in vitro* e ensaios *in vivo* realizados em mamíferos. Desde a sua apresentação como modelo alternativo em 1981 (Streisinger et al., 1981), o número de artigos científicos utilizando o zebrafish como modelo biológico cresceu rapidamente e hoje seu emprego nas pesquisas biomédicas percorrem diversas áreas de conhecimento, tais como: genética (Sarasamma et al., 2017), desenvolvimento (Ramanagoudr-Bhojappa et al., 2018), comportamento (Deakin et al., 2019), metabolismo celular (Santoro, 2014; Azevedo et al., 2021), câncer (Hason e Bartůněk, 2019), medicina regenerativa (Sehring e Weidinger, 2020), toxicologia (Azevedo et al., 2020), fisiologia (Mierzwa et al., 2020), farmacologia (Bao et al., 2019; Faria et al., 2019; Pitchai, Rajaretinam et al., 2019) e também em vários distúrbios cerebrais, como exemplo: depressão, autismo, psicoses, abuso de drogas, déficits cognitivos e hiperatividade (Kalueff, Stewart et al., 2014; Fontana, Franscescon et al., 2019). Agora, é possível incluir o zebrafish como um novo modelo experimental para o estudo da PA, bem como dos processos de culminam no surgimento da doença.

Nos últimos cinco anos (2018-2022) o destaque dos estudos publicados no mundo relacionados a PA se concentrou na busca por drogas e por novas terapias para diminuir os efeitos decorrentes da PA (Falcão et al., 2022) visto que a PA é uma doença recorrente em internamentos com 34 casos para 100.000 pessoas por ano em todo o mundo (Zheng et al., 2021) e assume a quinta posição das principais causas de mortes hospitalares (Lankisch et al., 2015). Novos protocolos de PA em outros

modelos animais, como o apresentado por este manuscrito, ajudará os pesquisadores na melhor compreensão da fisiopatologia da doença e no desenvolvimento de terapias farmacológicas que visem interromper o progresso da doença já que o principal motivo para a gravidade do quadro da PA durante a fase inicial é a duração da resposta inflamatória em determinados órgãos como rins, pulmão e coração. Quando a resposta inflamatória nos órgãos se resolve dentro das primeiras 48 h a doença não evolui para o estado grave (Johnson e Abu-Hilal, 2004). Entretanto, quando a resposta inflamatória persiste e afeta mais de um órgão do sistema, é denominado síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) que pode evoluir para falência de múltiplos órgãos (MOF). A duração da MOF em pacientes está associada a mortalidade na PA grave (Mofidi et al., 2006; Banks et al., 2013).

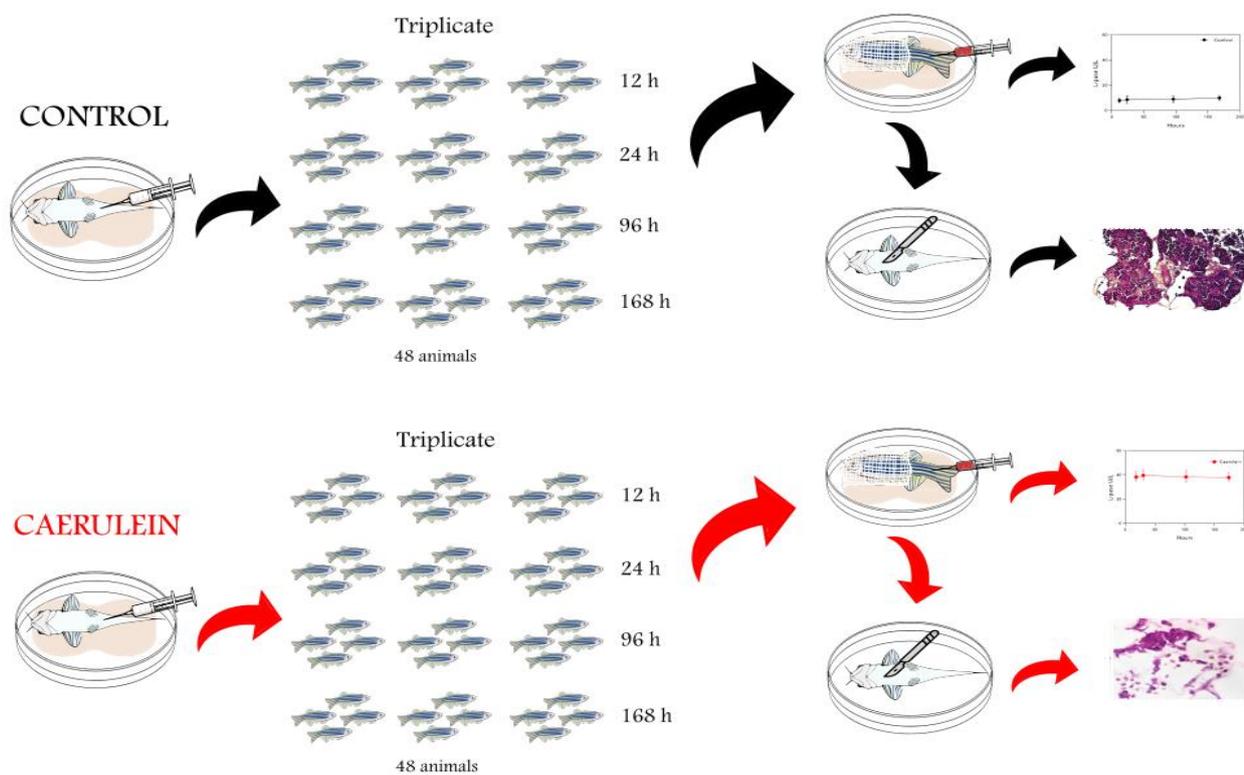
Conclusão

Nossos resultados confirmam a indução efetiva da PA em *Danio rerio* e demonstram a aplicabilidade do zebrafish como modelo biológico da PA. Considerando que o genoma do zebrafish possui alta similaridade com o genoma de referência humano, as informações obtidas em estudos utilizando o zebrafish podem levar a resultados aplicáveis à humanos. Por essa razão, o estabelecimento de um novo modelo animal experimental para estudos da PA amplia as possibilidades para compreensão da doença além de proporcionar novos caminhos para abordagens terapêuticas.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo a ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco pela bolsa de pesquisa e de auxílio financeiro (PBPG-1320-2.07/2018; APQ-0166-4.03/19) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – DCR-0010-4.03/20) pela concessão de bolsa de pesquisa.

Figura 5 - GRAPHICAL ABSTRACT



Referências

Cunha, J.E.M. Acute pancreatitis: a clinically based classification. *Arq Gastroenterol*, v. 31, n 2, p. 52-56, Apr-Jun 1994.

Bradley, E.L. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992.

Habtezion, A., Gukovskaya, A.S., Pandol, S.J. Acute Pancreatitis: A Multifaceted Set of Organelle and Cellular Interactions. *Gastroenterology*, v.156, n 7, p. 1941-1950, 2019. doi: 10.1053/j.gastro.2018.11.082.

Garg, P.K., Singh V.P. Organ Failure Due to Systemic Injury in Acute Pancreatitis. *Gastroenterology*;156(7):2008-2023, 2019. doi: 10.1053/j.gastro.2018.12.041.

Xiao, A.Y., Tan, M.L., Wu, L.M., Asrani, V.M., Windsor, J.A., Yadav, D., Petrov, M.S. Global incidence and mortality of pancreatic diseases: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression of population-based cohort studies. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 1(1):45-55, 2016. doi: 10.1016/S2468-1253(16)30004-8.

Kambhampati, S., Park, W., Habtezion, A. Pharmacologic therapy for acute pancreatite. *Mundo J Gastroenterol*, 7; 20 (45): 16868-80, 2014. doi: 10.3748/wjg.v20.i45.16868.

Gorelick FS, Lerch MM. Do Animal Models of Acute Pancreatitis Reproduce Human Disease? *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 10; 4 (2): 251-262, 2017. doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.05.007.

Hegyi, P., Rakonczay, Z. Jr., Sári, R., Góg, C., Lonovics, J., Takács, T., Czakó, L. L-arginine-induced experimental pancreatitis. *World J Gastroenterol*, 15; 10 (14): 2003-9, 2004. doi: 10.3748/wjg.v10.i14.2003.

Zhu, H., L. Huang, S. Zhu, X. Li, Z. Li, C. Yu and X. Yu. "Regulation of autophagy by systemic admission of microRNA-141 to target HMGB1 in L-arginine-induced acute pancreatitis in vivo. *Pancreatology*, 16(3): 337-346, 2016.

Su, K.H., Cuthbertson, C., Christophi, C. Review of experimental animal models of acute pancreatitis. *HPB (Oxford)*, 8 (4): 264-86, 2006. doi: 10.1080/13651820500467358.

Aho, H.J., Koskensalo, S.M., Nevalainen, T.J. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol*, 15 (4):411-6, 1980. doi: 10.3109/00365528009181493.

Lampel, M., Kern, H.F. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch. A Path. Anat. and Histol.* 373, 97–117, 1977. doi:10.1007/BF00432156

Niederau, C., Ferrell, C.D., Grendell, J.H. Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin. *Gastroenterology*. v. 88 p. 1192–1204, 1985.

Manso, M.A., San Román, J.I., de Dios, I., García, L.J., López, M.A. Cerulein-induced acute pancreatitis in the rat. Study of pancreatic secretion and plasma VIP and secretin levels. *Dig Dis Sci*, 37 (3): 364-8, 1992. doi: 10.1007/BF01307729.

Zhang, J., Rouse, R.L. Histopathology and pathogenesis of caerulein-, duct ligation-, and arginine-induced acute pancreatitis in Sprague-Dawley rats and C57BL6 mice. *Histol Histopathol*, 29 (9): 1135-52, 2014. doi: 10.14670/HH-29.1135.

Ulmasov, B., Oshima, K., Rodriguez, M.G., Cox, R.D., Neuschwander-tetri, B.A. Differences in the degree of cerulein-induced chronic pancreatitis in C57BL/6 mouse

substrains lead to new insights in identification of potential risk factors in the development of chronic pancreatitis. *Am J Pathol.*, v 183 , p. 692–708, 2013.

Rosa, C. E. et al. Metabolic rate and reactive oxygen species production in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, v. 149, n. 1, p. 209-214, 2008.

Leite, C. E. et al. Analytical method for determination of nitric oxide in zebrafish larva e: toxicological and pharmacological applications. *Anal Biochem*, v. 421, n. 2, p. 534-40, 2012.

Nik, S. H. M. et al. The Comparison of Methods for Measuring Oxidative Stress in Zebrafish Brains. *Zebrafish*, v. 11, n. 3, p. 248-254, 2014.

Lleras-Forero, L., Winkler, C., Schulte-Merker, S. Zebrafish and medaka as models for biomedical research of bone diseases. *Dev Biol*, 15;457(2):191-205, 2020. doi: 10.1016/j.ydbio.2019.07.009.

Bauer, B., Mally, A., Liedtke, D. Zebrafish Embryos and Larvae as Alternative Animal Models for Toxicity Testing. *Int J Mol Sci*, 14;22(24):13417, 2021. doi: 10.3390/ijms222413417.

Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann and T. F. Schilling. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*, 203(3): 253-310, 1995.

Lieschke, G.J., Currie, P.D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet*, 8. 5):353-67, 2007. doi: 10.1038/nrg2091. 17440532.

Cassar, S., Adatto, I., Freeman, J.L., Gamse, J.T., Iturria, I., Lawrence, C., Muriana, A., Peterson, R.T., Van Cruchten, S., Zon, L.I. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chem Res Toxicol*, 21;33(1):95-118, 2020. doi: 10.1021/acs.chemrestox.9b00335.

Sehring, I.M., Weidinger, G. Recent advancements in understanding fin regeneration in zebrafish. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 9(1):e367, 2020. doi: 10.1002/wdev.367.

Diep, C. Q., D. Ma, R. C. Deo, T. M. Holm, R. W. Naylor, N. Arora, R. A. Wingert, F. Bollig, G. Djordjevic, B. Lichman, H. Zhu, T. Ikenaga, F. Ono, C. Englert, C. A. Cowan, N. A. Hukriede, R. I. Handin and Davidson, A. J. Identification of adult nephron progenitors capable of kidney regeneration in zebrafish. *Nature*, 470(7332): 95-100, 2011.

Kroeger, P. T., Jr. and Wingert, R. A. Using zebrafish to study podocyte genesis during kidney development and regeneration. *Genesis*, 52(9): 771-792, 2014.

Poss, K.D., Wilson, L.G., Keating, M.T. Heart regeneration in zebrafish. *Science*, 13; 298 (5601): 2188-90, 2002. doi: 10.1126/science.1077857.

Brezitski, K.D., Goff, A.W., DeBenedittis, P., Karra, R. A Roadmap to Heart Regeneration Through Conserved Mechanisms in Zebrafish and Mammals. *Curr Cardiol*, 2; 23 (4): 29, 2021. doi: 10.1007/s11886-021-01459-6.

Ghosh, S. and Hui, S. P. Regeneration of Zebrafish CNS: Adult Neurogenesis. *Neural Plast*, 2016:5815439, 2016.

Prince, V.E., Anderson, R.M., Dalgin, G. Zebrafish Pancreas Development and Regeneration: Fishing for Diabetes Therapies. *Curr Top Dev Biol.*; 124:235-276, 2017. doi: 10.1016/bs.ctdb.2016.10.005.

Howe, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/nature12111 >.

Niklaus, S., Neuhauss, S.C.F. Genetic approaches to retinal research in zebrafish. *J Neurogenet*, 31 (3): 70-87, 2017. doi: 10.1080/01677063.2017.1343316.

Lin, E., Shafaattalab, S., Gill, J., Al-Zeer, B., Craig, C., Lamothe, M., Rayani, K., Gunawan, M., Li, A.Y., Hove-Madsen, L., Tibbits, G.F. Physiological phenotyping of the adult zebrafish heart. *Mar Genomics*, 49: 100701, 2020. doi: 10.1016/j.margen.2019.100701

Dasgupta, S., Simonich, M.T., Tanguay, R.L. Zebrafish Behavioral Assays in Toxicology. *Methods Mol Biol*, 2474:109-122, 2022. doi: 10.1007/978-1-0716-2213-1_11.

Stewart, A., Cachat, J.M., Suciu, C., Hart, P.C., Gaikwad, S., Utterback, E., Dileo, J., Kalueff, A.V. Intraperitoneal Injection as a Method of Psychotropic Drug Delivery in Adult Zebrafish. In: Kalueff, A.V.; Cachat, J.M. *Zebrafish Neurobehavioral Protocols*. Springer, cap. 14, 2011.

Matthews, M., and Varga, Z. M. Anesthesia and Euthanasia in Zebrafish, *ILAR Journal*, v 53, n 2, 192–204, 2012. doi: 10.1093/ilar.53.2.192.

Ozer Cakir O, Esen H, Toker A, Ataseven H, Demir A, Polat H. Effects of diclofenac sodium and octreotide on treatment of caerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Oct 15;8(10):17551-64. PMID: 26770346; PMCID: PMC4694246.

Xiong, G.F., Li, D.W., Zheng, M.B., Liu, S.C. The Effects of Lycium Barbarum Polysaccharide (LBP) in a Mouse Model of Cerulein-Induced Acute Pancreatitis. *Med Sci Monit*, 25; 25: 3880-3886, 2019. doi: 10.12659/MSM.913820.

Lv, C., Jin Q. Maresin-1 Inhibits Oxidative Stress and Inflammation and Promotes Apoptosis in a Mouse Model of Caerulein-Induced Acute Pancreatitis. *Med Sci Monit*, 31; 25: 8181-8189, 2019. doi: 10.12659/MSM.917380.

Yang, J., Tang, X., Li, B., Shi, J. Sphingosine 1-phosphate receptor 2 mediated early stages of pancreatic and systemic inflammatory responses via NF-kappa B activation

in acute pancreatitis. *Cell Commun Signal*, 13; 20 (1): 157, 2022. doi: 10.1186/s12964-022-00971-8.

Aljomah, A.S., Hammami, M.M. Superfluous amylase/lipase testing at a tertiary care hospital: a retrospective study. *Ann Saudi Med*. 39 (5): 354-358, 2019. doi: 10.5144/0256-4947.2019.354.

Rompianesi, G., Hann, A., Komolafe, O., Pereira, S.P., Davidson, B.R., Gurusamy, K.S. Serum amylase and lipase and urinary trypsinogen and amylase for diagnosis of acute pancreatitis. *Cochrane Database Syst Rev*, 21; 4 (4): CD012010, 2017. doi: 10.1002/14651858.

Ismail, O.Z, Bhayana V. Lipase or amylase for the diagnosis of acute pancreatitis? *Clin Biochem*. 50 (18): 1275-1280, 2017. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2017.07.003.

Matull, W.R., Pereira, S.P., O'Donohue, J.W. Biochemical markers of acute pancreatitis. *J Clin Pathol*, 59 (4): 340-4, 2016. doi: 10.1136/jcp.2002.002923.

Foster, J.R. A Review of Animal Models of Nonneoplastic Pancreatic Diseases. *Toxicologic Pathology*, 42 (1): 243-259, 2014. doi:10.1177/0192623313508479.

Tani, S., Otsuki, M., Itoh, H., Fujii, M., Nakamura, T., Oka, T., Baba, S. Histologic and biochemical alterations in experimental acute pancreatitis induced by supramaximal caerulein stimulation. *Int J Pancreatol*, 2(5-6):337-48, 1987. doi: 10.1007/BF02788433.

Norkina, O., Graf, R., Appenzeller, P., De Lisle, R.C. Caerulein-induced acute pancreatitis in mice that constitutively overexpress Reg/PAP genes. *BMC Gastroenterol*, 15;6:16, 2006. doi: 10.1186/1471-230X-6-16.

Cao, J., Liu, Q. Protective effects of sivelestat in a caerulein-induced rat acute pancreatitis model. *Inflammation*, 36(6):1348-56, 2013. doi: 10.1007/s10753-013-9674-3.

Zhang, L., Zhang, J., Shea, K., Xu, L., Tobin, G., Knapton, A., Sharron, S., Rouse, R. Autophagy in pancreatic acinar cells in caerulein-treated mice: immunolocalization of related proteins and their potential as markers of pancreatitis. *Toxicol Pathol*, 42(2):435-57, 2014. doi: 10.1177/0192623313486967.

Hirano, T., Saluja, A., Ramarao, P., Lerch, M.M., Saluja, M., Steer, M.L. Apical secretion of lysosomal enzymes in rabbit pancreas occurs via a secretagogue regulated pathway and is increased after pancreatic duct obstruction. *J Clin Invest*, 87 (3): 865-9, 1991. doi: 10.1172/JCI115091.

Lerch, M.M., Saluja, A.K., Dawra, R., Ramarao, P., Saluja, M., Steer, M.L. Acute necrotizing pancreatitis in the opossum: earliest morphological changes involve acinar cells. *Gastroenterology*, 103 (1): 205-13, 1992. doi: 10.1016/0016-5085(92)91114-j.

Wedgwood, K.R., Farmer, R.C., Reber, H.A. A model of hemorrhagic pancreatitis in cats--role of 16,16-dimethyl prostaglandin E2. *Gastroenterology*, 90 (1): 32-9, 1986. doi: 10.1016/0016-5085(86)90071-5.

Owyang, C., Logsdon, C.D. New insights into neurohormonal regulation of pancreatic secretion. *Gastroenterology*, 127: 957–969, 2004.

Zhan, X., Wang, F., Bi, Y., Ji, B. Animal models of gastrointestinal and liver diseases. Animal models of acute and chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 1; 311 (3): G343-55, 2016. doi: 10.1152/ajpgi.00372.2015.

Mareninova, O.A., Sung, K.F., Hong, P., Lugea, A., Pandol, S.J., Gukovsky, I., Gukovskaya, A.S. Cell death in pancreatitis: caspases protect from necrotizing pancreatitis. *J Biol Chem*, 10;281(6):3370-81, 2006. doi: 10.1074/jbc.M511276200.

Streisinger, G., Walker, C., Dower, N. et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 291, 293–296, 1981. doi: 10.1038/291293a0.

Sarasamma, S., Varikkodan, M.M., Lian, S.T., Lin, Y.C., Wang, W.P., Hsiao, C.D. Zebrafish: A Premier Vertebrate Model for Biomedical Research in Indian Scenario. *Zebrafish*, 14(6):589-605, 2017. doi: 10.1089/zeb.2017.1447.

Ramanagoudr-Bhojappa, R., Carrington, B., Ramaswami, M., Bishop, K., Robbins, G.M., Jones, M. Harper, U., Frederickson, S.C., Kimble, D.C., Sood, R., Chandrasekharappa, S.C. Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated knockout of 19 Fanconi anemia pathway genes in zebrafish revealed their roles in growth, sexual development and fertility. *PLoS Genet*, 12;14 (12): e1007821, 2018. doi: 10.1371/journal.pgen.1007821.

Deakin, A.G., Buckley, J., AlZu'bi, H.S., Cossins, A.R., Spencer, J.W., Al'Nuaimy, W., Young, I.S., Thomson, J.S., Sneddon, L.U. Automated monitoring of behaviour in zebrafish after invasive procedures. *Sci Rep.*, 21;9(1):9042, 2019. doi: 10.1038/s41598-019-45464-w.

Santoro, M. M. Zebrafish as a model to explore cell metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 25(10): 546-554, 2014.

Azevedo, R.D.S., Falcão, K.V.G., Assis, C.R.D., Martins, R.M.G., Araújo, M.C., Yogui, G.T., Neves, J.L., Seabra, G.M., Maia, M.B.S., Amaral, I.P.G., Leite, A.C.R., Bezerra, R.S. Effects of pyriproxyfen on zebrafish brain mitochondria and acetylcholinesterase. *Chemosphere*, 263: 128029, 2021. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128029.

Hason, M., Bartůněk, P. Zebrafish Models of Cancer-New Insights on Modeling Human Cancer in a Non-Mammalian Vertebrate. *Genes (Basel)*, 15;10(11):935, 2019. doi: 10.3390/genes10110935.

Azevedo, R.D.S., Falcão, K.V.G., Amaral, I.P.G., Leite, A.C.R., Bezerra, R.S. Mitochondria as targets for toxicity and metabolism research using zebrafish. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 1864 (8): 129634, 2020. doi: 10.1016/j.bbagen.2020.129634.

Mierzwa, A.S., Nguyen, F., Xue, M., Jonz, M.G. Regeneration of the gill filaments and replacement of serotonergic neuroepithelial cells in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Respir Physiol Neurobiol*, 274:103366, 2020. doi: 10.1016/j.resp.2019.103366.

Bao, W., Volgin, A. D., Alpyshov, E. T., Friend, A. J., Strekalova, T. V., de Abreu, M. S., Collins, C., Amstislavskaya, T. G., Demin, K. A. and Kalueff, A. V. Opioid Neurobiology, Neurogenetics and Neuropharmacology in Zebrafish. *Neuroscience*, 404: 218-232, 2020.

Faria, M., Prats, E., Gómez-Canela, C., Hsu, C. Y., Arick, M. A., Bedrossiantz, J., Orozco, M., Garcia-Reyero, N., Ziv, T., Ben-Lulu, S., Admon, A., Gómez-Oliván, L. M. and Raldúa D. Therapeutic potential of N-acetylcysteine in acrylamide acute neurotoxicity in adult zebrafish. *Sci Rep*, 9(1): 16467, 2019.

Pitchai, A., Rajaretinam, R. K. and Freeman, J. L. Zebrafish as an Emerging Model for Bioassay-Guided Natural Product Drug Discovery for Neurological Disorders. *Medicines*, (Basel) 6(2), 2019.

Kalueff, A. V., Stewart, A. M. and Gerlai, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol Sci*, 35(2): 63-75, 2014.

Fontana, B. D., Franscescon, F., Rosemberg, D. B., Norton, W. H. J., Kalueff, A. V. and Parker, M. O. Zebrafish models for attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Neurosci Biobehav Ver*, 100: 9-18, 2019.

Falcão, K. V. G., Azevedo, R. D. S. de., Lima, L. R. A. de., Bezerra, R. de S. Global analysis to acute pancreatitis: a systematic review. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 11, n. 11, p. e470111133920, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i11.33920. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/33920>. Acesso em: 30 sep. 2022.

Zheng, Z., Ding, Y.-X., Qu, Y.-X., Cao, F. and Li, F. A narrative review of the mechanism of acute pancreatitis and recent advances in its clinical management. *American journal of translational research* ,13(3): 833-852, 2021.

Lankisch, P.G., Apte, M., Banks, P.A. Acute pancreatitis. *Lancet*, 4;386(9988):85-96, 2015. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60649-8.

Mofidi, R., Duff, M.D., Wigmore, S.J., Madhavan, K.K., Garden, O.J., Parks, R.W. Association between early systemic inflammatory response, severity of multiorgan dysfunction and death in acute pancreatitis. *Br J Surg*, 93(6):738-44, 2006. doi: 10.1002/bjs.5290.

Banks, P.A., Bollen, T.L., Dervenis, C., Gooszen, H.G., Johnson, C.D., Sarr, M.G., Tsiotos, G.G., Vege, S.S. Acute Pancreatitis Classification Working Group. Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut*, 62(1):102-11, 2013. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302779.

R.A. Kimmel, D. Meyer, Chapter 13 - Zebrafish pancreas as a model for development and disease, Editor(s): H. William Detrich, Monte Westerfield, Leonard I. Zon, *Methods in Cell Biology*, Academic Press, Volume 134, 2016, Pages 431-461.

Faraj, N., Duinkerken, B.H.P., Carroll, E.C. and Giepmans, B.N.G. (2022), Microscopic modulation and analysis of islets of Langerhans in living zebrafish larvae. *FEBS Lett*, 596: 2497-2512.

Ammer-Herrmenau C, Wolf L, Nasrin SS, Ramu I, Roggiolani R, Goetze RG, Buchholz SM, Sendler M, Ellenrieder V, Neesse A. Activity of acute pancreatitis is modified by secreted protein acidic and rich in cysteine ablation. *United European Gastroenterol J*. 2022 Jul;10(6):544-555.

5 CONCLUSÕES

A PA é um tópico amplamente publicado em periódicos distribuídos por todo mundo nos últimos cinco anos, destacando ser uma questão importante e globalmente discutida. Países como os EUA e a China ocupam posição de vanguarda neste assunto e dentre os principais temas presentes nas publicações, a busca por novos tratamentos terapêuticos assume a liderança. Um dos desafios para tratamento da PA está relacionado a divergência de resultados em estudos com modelos animais estabelecidos.

Reverenciando o reconhecimento do zebrafish como modelo altamente empregado em pesquisas biomédicas e para inúmeras doenças humanas, esta análise dá o primeiro passo para a caeruleína.

Dosagens menores de caeruleína foram efetivas para indução da PA no zebrafish em comparação com outros modelos animais consagrados, além de apresentar menor tempo para indução da inflamação. As respostas fisiológicas a caeruleína exibiram resultados semelhantes aos humanos com alterações histológicas compatíveis aos achados clínicos e elevação de marcadores biológicos como amilase e lipase. Incluindo semelhanças até no tempo de duração da atividade enzimática da lipase na corrente sanguínea durante o curso da doença.

O modelo de PA no zebrafish representa uma alternativa promissora e econômica aos modelos de roedores. O zebrafish é capaz de relacionar com sucesso eventos locais de inflamação pancreática além de poder simplificar a fisiopatologia dos órgãos humanos devido a um alto nível de conservação genética, morfológicas e funcionais de órgãos humanos, tal como o pâncreas.

Portanto, este vertebrado assume o papel fundamental em preencher as lacunas entre modelos *in vitro* e em mamíferos da PA e possibilita abrir as portas para novas pesquisas de terapia para PA, juntamente com o estudo da falência de múltiplos órgãos em casos de evolução da PA.

6 SÚMULA CURRICULAR

Participação em eventos

- 1º Congresso Científico da FIC - CienFIC 2020. (Avaliador de trabalhos científicos).
- Simpósio: II Semana Científica do Agreste Pernambucano 2020. (Avaliador de trabalhos científicos).
- IV Semana de Biomedicina: A saúde além do microscópio. O papel do biomédico na citologia clínica (UniFG) 2020 (Palestrante).
- Simpósio: II International Workshop on Cellular and Molecular Biology. 2021 (Ouvinte).
- 'I Encontro do PPGCB: A ciência como uma ferramenta da AGENDA 2030 para o desenvolvimento sustentável', CB - UFPE 2022 (Ouvinte).

Apresentação de trabalhos em congressos

- COSTA, M. T. T.; MARQUES, M. G. R.; FALCÃO, K. V. G.; AZEVEDO, R. D. S. Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo alternativo em oftalmologia (UPE) 2019.
- FALCÃO, KÍVIA VANESSA GOMES; AZEVEDO, RAFAEL DAVID SOUTO DE; LIMA, LUIZA RAYANNA AMORIM DE; BEZERRA, RANILSON DE SOUZA. 'GLOBAL ANALYSIS TO ACUTE PANCREATITIS' durante o evento "I Encontro do PPGCB: A ciência como uma ferramenta da AGENDA 2030 para o desenvolvimento sustentável", UFPE 2022.

Artigos publicados em periódicos

- AZEVEDO, R. D. S.; FALCÃO, K. V. G.; IAN PORTO GURGEL DO AMARAL; LEITE, A. C. R.; BEZERRA, R. S. Mitochondria as targets for toxicity and metabolism research using zebrafish. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, v. 1864, p. 129634-129634, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129634> .
- AZEVEDO, RAFAEL D.S.; FALCÃO, KÍVIA V.G.; ASSIS, CAIO R.D.; MARTINS, REGILDO M.G.; ARAÚJO, MARLYETE C.; YOGUI, GILVAN T.;

NEVES, JORGE L.; SEABRA, GUSTAVO M.; MAIA, MARIA B.S.; AMARAL, IAN P.G.; LEITE, ANA C.R.; BEZERRA, RANILSON S. Effects of pyriproxyfen on zebrafish brain mitochondria and acetylcholinesterase. CHEMOSPHERE, v. 263, p. 128029, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128029>.

- FALCÃO, KÍVIA VANESSA GOMES; AZEVEDO, RAFAEL DAVID SOUTO DE; LIMA, LUIZA RAYANNA AMORIM DE; BEZERRA, RANILSON DE SOUZA. Global analysis to acute pancreatitis: a systematic review. RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT, v. 11, p. e470111133920, 2022. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i11.33920> .

Capítulos de livros publicados

- FALCAO, K. V. G.; MARQUES, M. G. R.; COSTA, M. T. T.; AZEVEDO, RAFAEL D.S. CONTRIBUIÇÕES DO ZEBRAFISH (Danio rerio) PARA PESQUISA OFTALMOLÓGICA. In: Benedito Rodrigues da Silva Neto. (Org.). Abordagens em medicina: Estado cumulativo de bem estar físico, mental e psicológico 2. 1ed.Ponta Grossa - PR: Atena Editora, 2021, v. 2, p. 91-96. <https://doi.org/10.22533/at.ed.703212211> .

7 REFERÊNCIAS

Aceto J, Nourizadeh-Lillabadi R, Marée R, et al. Zebrafish Bone and General Physiology Are Differently Affected by Hormones or Changes in Gravity. *PLoS One*. 2015;10(6):e0126928. Published 2015 Jun 10. doi:10.1371/journal.pone.0126928.

Al-Massadi O, Fernø J, Diéguez C, Nogueiras R, Quiñones M. Glucagon Control on Food Intake and Energy Balance. *Int J Mol Sci*. 2019;20(16):3905. Published 2019 Aug 11. doi:10.3390/ijms20163905.

Amaral, I. P.; Johnston, I. A. Insulin-like growth factor (IGF) signalling and genome-wide transcriptional regulation in fast muscle of zebrafish following a single-satiating meal. *J Exp Biol*, v. 214, n. Pt 13, p. 2125-39, Jul 1 2011. ISSN 0022-0949.

Anastasi A, Bertaccini G, Cei JM, De Caro G, Erspamer V, Impicciatore M, Roseghini M. Presence of caerulein in extracts of the skin of *Leptodactylus pentadactylus labyrinthicus* and of *Xenopus laevis*. *Br J Pharmacol*. 1970 Jan;38(1):221-8. doi: 10.1111/j.1476-5381.1970.tb10351.x. PMID: 5413288; PMCID: PMC1702644.

Anastasi A, Erspamer V, Endean R. Isolation and structure of caerulein, an active decapeptide from the skin of *Hyla caerulea*. *Experientia*. 1967 Sep 15;23(9):699-700. doi: 10.1007/BF02154119. PMID: 6062875.

Andoh T. Insulin. *Handbook of Hormones*. 2016. Subchapter 19A, p 157-e19A-3.

Apponyi MA, Pukala TL, Brinkworth CS, Maselli VM, Bowie JH, Tyler MJ, Booker GW, Wallace JC, Carver JA, Separovic F, Doyle J, Llewellyn LE. Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance. *Peptides*. 2004 Jun;25(6):1035-54. doi: 10.1016/j.peptides.2004.03.006. PMID: 15203252.

Argenton F., Zecchin E., Bortolussi M. Early appearance of pancreatic hormone-expressing cells in the zebrafish embryo. *Mech Dev.* Sep;87(1-2):217-21,1999. doi: 10.1016/s0925-4773(99)00151-3. PMID: 10495291.

Arunachalam, M., M. Raja, C. Vijayakumar, P. Malaiammal and R. L. Mayden (2013). "Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India." *Zebrafish* 10(1): 1-14.

Atkinson, M.A., Campbell-Thompson, M., Kusmartseva, I. et al. Organisation of the human pancreas in health and in diabetes. *Diabetologia* 63, 1966–1973 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05203-7>

Azevedo RDS, Falcão KVG, Amaral IPG, Leite ACR, Bezerra RS. Mitochondria as targets for toxicity and metabolism research using zebrafish. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2020 Aug;1864(8):129634. doi: 10.1016/j.bbagen.2020.129634. Epub 2020 May 15. PMID: 32417171.

Azevedo RDS, Falcão KVG, Assis CRD, Martins RMG, Araújo MC, Yogui GT, Neves JL, Seabra GM, Maia MBS, Amaral IPG, Leite ACR, Bezerra RS. Effects of pyriproxyfen on zebrafish brain mitochondria and acetylcholinesterase. *Chemosphere.* 2021 Jan;263:128029. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.128029. Epub 2020 Aug 23. PMID: 33297050.

Baek JS, Fang L, Li AC, Miller YI. Ezetimibe and simvastatin reduce cholesterol levels in zebrafish larvae fed a high-cholesterol diet. *Cholesterol* 2012: 564705, 2012. doi:10.1155/2012/564705.

Bálint, E. R., G. Fűr, L. Kiss, D. I. Németh, A. Soós, P. Hegyi, Z. Szakács, B. Tinusz, P. Varjú, Á. Vincze, B. Eröss, J. Czimmer, Z. Szepes, G. Varga and Z. Rakonczay (2020). "Assessment of the course of acute pancreatitis in the light of aetiology: a systematic review and meta-analysis." *Scientific Reports* 10(1): 17936.

Banerjee S, Yachimski P. Pancreatitis, Pathobiology of Human Disease. 2014. p. 2243-2250.

Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, Gooszen HG, Johnson CD, Sarr MG, Tsiotos GG, Vege SS; Acute Pancreatitis Classification Working Group. Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut*. 2013 Jan;62(1):102-11. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302779. Epub 2012 Oct 25. PMID: 23100216.

Bao, W., A. D. Volgin, E. T. Alpyshov, A. J. Friend, T. V. Strekalova, M. S. de Abreu, C. Collins, T. G. Amstislavskaya, K. A. Demin and A. V. Kalueff (2019). "Opioid Neurobiology, Neurogenetics and Neuropharmacology in Zebrafish." *Neuroscience* 404: 218-232.

Barbeiro DF, Koike MK, Coelho AMM, da Silva FP, Machado MCC. Intestinal barrier dysfunction and increased COX-2 gene expression in the gut of elderly rats with acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2016, 6(1): p 52-56.

Barbieux, C., Parnaud, G., Lavallard, V., Brioude, E., Meyer, J., Alibashe Ahmed, M., Berishvili, E., Berney, T., & Bosco, D. (2016). Asymmetrical distribution of δ and PP cells in human pancreatic islets, *Journal of Endocrinology*, 229(2), 123-132. Retrieved Jul 18, 2021, from <https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/229/2/123.xml>

Beis D, Stainier DY. In vivo cell biology: following the zebrafish trend. *Trends Cell Biol*. 2006 Feb;16(2):105-12. doi: 10.1016/j.tcb.2005.12.001. Epub 2006 Jan 10. PMID: 16406520.

Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 16129675, Ceruletide; [cited 2021 July 13]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ceruletide>.

Bhatia M, Wong FL, Cao Y, Lau HY, Huang J, Puneet P, Chevali L. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatology*.. 5(2-3): p. 132-144, 2005.

Biczó G, Hegyi P, Dósa S, Shalbuyeva N, Berczi S, Sinervirta R, Hracskó Z, Siska A, Kukor Z, Jármay K, Venglovecz V, Varga IS, Iványi B, Alhonen L, Wittmann T, Gukovskaya A, Takács T, Rakonczay Z Jr. The crucial role of early mitochondrial injury in L-lysine-induced acute pancreatitis. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Nov 15;15(10):2669-81, 2011. doi: 10.1089/ars.2011.4065.

Biczo G, Vegh ET, Shalbueva N, Mareninova OA, Elperin J, Lotshaw E, Gretler S, Lugea A, Malla SR, Dawson D, Ruchala P, Whitelegge J, French SW, Wen L, Husain SZ, Gorelick FS, Hegyi P, Rakonczay Z Jr, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Mitochondrial Dysfunction, Through Impaired Autophagy, Leads to Endoplasmic Reticulum Stress, Deregulated Lipid Metabolism, and Pancreatitis in Animal Models. *Gastroenterology*. Feb;154(3):689-703, 2018. doi: 10.1053/j.gastro.2017.10.012.

Biemar F., Argenton F., Schmidtke R., Epperlein S., Peers B., Driever W. Pancreas development in zebrafish: early dispersed appearance of endocrine hormone expressing cells and their convergence to form the definitive islet. *Dev Biol*. Feb 15;230(2):189-203, 2001. doi: 10.1006/dbio.2000.0103.

Biemar, F., F. Argenton, R. Schmidtke, S. Epperlein, B. Peers and W. Driever. "Pancreas Development in Zebrafish: Early Dispersed Appearance of Endocrine Hormone Expressing Cells and Their Convergence to Form the Definitive Islet." *Developmental Biology* 230(2): 189-203, 2001.

Bierma, M. J., M. J. Coffey, S. Nightingale, P. F. van Rheenen and C. Y. Ooi. "Predicting severe acute pancreatitis in children based on serum lipase and calcium: A multicentre retrospective cohort study." *Pancreatology* 16(4): 529-534, 2016.

Bowie JH. Caeruleins. *Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition)*, Chapter 48, p. 338-341, 2013.

Boxhoorn, Lotte et al. Acute pancreatitis. *The Lancet*.. 396(10252): p. 726 – 734, 2020.

Bradley EL. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992.

Brenchley JM, Douek DC. Microbial translocation across the GI tract. *Annu Rev Immunol*, 30:149-73, 2012. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075001.

Briona, L. K. and R. I. Dorsky. "Radial glial progenitors repair the zebrafish spinal cord following transection." *Exp Neurol*, 256: 81-92, 2014.

Brugman, S. "The zebrafish as a model to study intestinal inflammation." *Developmental & Comparative Immunology*, 64: 82-92, 2016.

Buter A, Imrie CW, Carter CR, Evans S, McKay CJ. Dynamic nature of early organ dysfunction determines outcome in acute pancreatitis. *Br J Surg*, Mar;89(3):298-302, 2022. doi: 10.1046/j.0007-1323.2001.02025.x.

Ceci, M., V. Mariano and N. Romano. "Zebrafish as a translational regeneration model to study the activation of neural stem cells and role of their environment." *Rev Neurosci*, 30(1): 45-66, 2018.

Ceppa EP, Pitt HA, Hunter JL, Leys CM, Zyromski NJ, Rescorla FJ, Sandrasegaran K, Fogel EL, McHenry LW, Watkins JL, Sherman S, Lehman GA. Hereditary pancreatitis: endoscopic and surgical management. *J Gastrointest Surg*, May;17(5):847-56, 2013. Doi: 10.1007/s11605-013-2167-8.

Chakraborty C., Hsu C.H., Wen Z.H., Lin C.S., Agoramoorthy G. Zebrafish: a complete animal model for in vivo drug discovery and development. *Curr Drug Metab*. Feb;10(2):116-24, 2009. doi: 10.2174/138920009787522197. PMID: 19275547

Chatila AT, Bilal M, Guturu P. Evaluation and management of acute pancreatitis. *World journal of clinical cases*.;7(9): 1006-1020,2019.

Chen D, Li L, Yan J, Yang X, You Y, Zhou Y, Ling X. The loss of α SNAP downregulates the expression of occludin in the intestinal epithelial cell of acute pancreatitis model. *Pancreatology*. 2014 Sep-Oct;14(5):347-55. doi: 10.1016/j.pan.2014.06.007. Epub 2014 Jul 3. PMID: 25278303.

Chvanov M, Voronina S, Zhang X, Telnova S, Chard R, Ouyang Y, Armstrong J, Tanton H, Awais M, Latawiec D, Sutton R, Criddle DN, Tepikin AV. Knockout of the Mitochondrial Calcium Uniporter Strongly Suppresses Stimulus-Metabolism Coupling in Pancreatic Acinar Cells but Does Not Reduce Severity of Experimental Acute Pancreatitis. *Cells*. 2020 Jun 5;9(6):1407. doi: 10.3390/cells9061407. PMID: 32516955; PMCID: PMC7349284

Clapham, JC., et al. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature*, v. 406, n. 6794, p.415-418, 2000.

Clelland E, Peng C. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. *Mol Cell Endocrinol*. 2009 Nov 27;312(1-2):42-52. doi: 10.1016/j.mce.2009.04.009. Epub 2009 May 4. PMID: 19406202.

Corleto VD. Somatostatin and the gastrointestinal tract. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2010 Feb;17(1):63-8. doi: 10.1097/MED.0b013e32833463ed. PMID: 19907319.

Creutzfeldt, W. et al. Somatostatin and the stomach: Exocrine and endocrine aspects. *Metabolism - Clinical and Experimental*, V. 27, Issue 9, 1309 – 1315. 1978.

Criddle DN, Gerasimenko JV, Baumgartner HK, Jaffar M, Voronina S, Sutton R, Petersen OH, Gerasimenko OV. Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? *Cell Death Differ*. 2007 Jul;14(7):1285-94. doi: 10.1038/sj.cdd.4402150. Epub 2007 Apr 13. PMID: 17431416.

Da Cunha JE. Acute pancreatitis: a clinically based classification. *Arq Gastroenterol*. 1994.

Dabrowski, A., Konturek B, S.J., Konturek B, J. W. , Gabryelewicz, A. Role of oxidative stress in the pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis. *European Journal of Pharmacology*, v 377, p. 1- 11, 1999.

Daya A, Donaka R, Karasik D. Zebrafish models of sarcopenia. *Dis Model Mech*. 2020;13(3):dmm042689. Published 2020 Mar 30. doi:10.1242/dmm.042689.

De Caro G, Endean R, Erspamer V, Roseghini M. Occurrence of caerulein in extracts of the skin of *Hyla caerulea* and other Australian hylids. *Br J Pharmacol Chemother*. 1968;33(1):48-58. doi:10.1111/j.1476-5381.1968.tb00473.x

Deitch EA. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch Surg*. 1990 Mar;125(3):403-4. doi: 10.1001/archsurg.1990.01410150125024. PMID: 2407230.

Devani K, Charilaou P, Radadiya D, Brahmabhatt B, Young M, Reddy C. Acute pancreatitis: Trends in outcomes and the role of acute kidney injury in mortality- A propensity-matched analysis. *Pancreatol*. 2018 Dec;18(8):870-877. doi: 10.1016/j.pan.2018.10.002. Epub 2018 Oct 5. PMID: 30337224.

Diep, C. Q., D. Ma, R. C. Deo, T. M. Holm, R. W. Naylor, N. Arora, R. A. Wingert, F. Bollig, G. Djordjevic, B. Lichman, H. Zhu, T. Ikenaga, F. Ono, C. Englert, C. A. Cowan, N. A. Hukriede, R. I. Handin and A. J. Davidson (2011). "Identification of adult nephron progenitors capable of kidney regeneration in zebrafish." *Nature* 470(7332): 95-100.

Dilorio P.J., Moss J.B., Sbrogna J.L., Karlstrom R.O., Moss L.G. Sonic hedgehog is required early in pancreatic islet development. *Dev Biol*. Apr 1;244(1):75-84, 2002. doi: 10.1006/dbio.2002.0573. PMID: 11900460.

Dimastromatteo, J., Brentnall, T. & Kelly, K. Imaging in pancreatic disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14, 97–109 (2017). <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.144> DOI 10.1007/978-90-481-9060-7_2, C _ Springer Science+Business Media B.V. 2010

Dombernowsky T, Kristensen MO, Rysgaard S, Gluud LL, Novovic S. Risk factors for and impact of respiratory failure on mortality in the early phase of acute pancreatitis, *Pancreatology*. 2016, 16(5): p. 756-760.

Drake, r.l.; vogl, w.; mitchell, a.w.m. *Gray's anatomia para estudantes*. 1a ed. Elsevier editora ltda: rio de janeiro: 2005.

Drummond, I. A. and A. J. Davidson (2016). "Zebrafish kidney development." *Methods Cell Biol* 134: 391-429.

Ebarasi, L., A. Oddsson, K. Hultenby, C. Betsholtz and K. Tryggvason (2011). "Zebrafish: a model system for the study of vertebrate renal development, function, and pathophysiology." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 20(4): 416-424.

Echeazarra, L., M. P. Hortigón-Vinagre, O. Casis and M. Gallego (2020). "Adult and Developing Zebrafish as Suitable Models for Cardiac Electrophysiology and Pathology in Research and Industry." *Front Physiol* 11: 607860.

Elmunzer BJ. Reducing the risk of post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis. *Dig Endosc*. 2017 Nov;29(7):749-757. doi: 10.1111/den.12908. Epub 2017 Jul 19. PMID: 28636774.

Ellertsdóttir E, Lenard A, Blum Y, Krudewig A, Herwig L, Affolter M, Belting HG. Vascular morphogenesis in the zebrafish embryo. *Dev Biol*. 2010 May 1;341(1):56-65. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.10.035. Epub 2009 Nov 3. PMID: 19895803.

Ellett F, Lieschke GJ. Zebrafish as a model for vertebrate hematopoiesis. *Curr Opin Pharmacol*. 2010 Oct;10(5):563-70. doi: 10.1016/j.coph.2010.05.004. Epub 2010 Jun 9. PMID: 20538521.

Eliceiri, B. P., A. M. Gonzalez and A. Baird (2011). "Zebrafish model of the blood-brain barrier: morphological and permeability studies." *Methods Mol Biol* 686: 371-378.

Ellis H. Anatomy of the pancreas. *Surgery (Oxford)*. 2007, (25):2, 72-73.

Ellis, C., Ramzy, A. & Kieffer, T. Regenerative medicine and cell-based approaches to restore pancreatic function. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14, 612–628 (2017).
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.93>

Endlein T., Barnes W.J.P. (2015) Wet Adhesion in Tree and Torrent Frogs. In: Bhushan B. (eds) *Encyclopedia of Nanotechnology*. Springer, Dordrecht.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-6178-0_257-2

Engeszer, R. E., L. B. Patterson, A. A. Rao and D. M. Parichy (2007). "Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field." *Zebrafish* 4(1): 21-40.

Erlanson-Albertsson, C. The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism. *Acta Physiol Scand.*, v. 178, n. 4, p. 405-412, 2003.

Fang, L., C. Liu and Y. I. Miller (2014). "Zebrafish models of dyslipidemia: Relevance to atherosclerosis and angiogenesis." *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 163(2): 99-108.

Faria, M., A. Valls, E. Prats, J. Bedrossiantz, M. Orozco, J. M. Porta, L. M. Gómez-Oliván and D. Raldúa (2019). "Further characterization of the zebrafish model of acrylamide acute neurotoxicity: gait abnormalities and oxidative stress." *Sci Rep* 9(1): 7075.

Faria, M., E. Prats, C. Gómez-Canela, C. Y. Hsu, M. A. Arick, 2nd, J. Bedrossiantz, M. Orozco, N. Garcia-Reyero, T. Ziv, S. Ben-Lulu, A. Admon, L. M. Gómez-Oliván and D. Raldúa (2019). "Therapeutic potential of N-acetylcysteine in acrylamide acute neurotoxicity in adult zebrafish." *Sci Rep* 9(1): 16467.

Faria, M., T. Ziv, C. Gómez-Canela, S. Ben-Lulu, E. Prats, K. A. Novoa-Luna, A. Admon, B. Piña, R. Tauler, L. M. Gómez-Oliván and D. Raldúa (2018). "Acrylamide acute neurotoxicity in adult zebrafish." *Sci Rep* 8(1): 7918.

Field H.A., Dong P.D., Beis D., Stainier D.Y. Formation of the digestive system in zebrafish. II. Pancreas morphogenesis. *Dev Biol.* Sep 1;261(1):197-208, 2003. doi: 10.1016/s0012-1606(03)00308-7. PMID: 12941629.

Field, H. A., P. D. S. Dong, D. Beis and D. Y. R. Stainier (2003). "Formation of the digestive system in zebrafish. ii. pancreas morphogenesis☆." *Developmental Biology* 261(1): 197-208.

Fishman, M. C. (2001). "Genomics. Zebrafish--the canonical vertebrate." *Science* 294(5545): 1290-1291.

Fontana, B. D., F. Franscescon, D. B. Rosemberg, W. H. J. Norton, A. V. Kalueff and M. O. Parker (2019). "Zebrafish models for attention deficit hyperactivity disorder (ADHD)." *Neurosci Biobehav Rev* 100: 9-18.

Freudenblum J., Meyer D., Kimmel R.A. Inducible Mosaic Cell Labeling Provides Insights Into Pancreatic Islet Morphogenesis. *Front Cell Dev Biol.* Sep 25;8:586651, 2020. doi: 10.3389/fcell.2020.586651. PMID: 33102488; PMCID: PMC7546031.

Fujinaga Y, Kadoya M, Kawa S, Hamano H, Ueda K, Momose M, Kawakami S, Yamazaki S, Hatta T, Sugiyama Y. Characteristic findings in images of extra-pancreatic lesions associated

Ghosh, S. and S. P. Hui (2016). "Regeneration of Zebrafish CNS: Adult Neurogenesis." *Neural Plast* 2016: 5815439.

Gnügge, L., D. Meyer and W. Driever (2004). *Pancreas Development in Zebrafish. Methods in Cell Biology*, Academic Press. 76: 531-551.

Goessling, W. and K. C. Sadler (2015). "Zebrafish: an important tool for liver disease research." *Gastroenterology* 149(6): 1361-1377.

Gore AV, Monzo K, Cha YR, Pan W, Weinstein BM. Vascular development in the zebrafish. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(5):a006684. doi:10.1101/cshperspect.a006684

Gorelick FS, Jamieson JD. Structure–function Relationships in the Pancreatic Acinar Cell. *Physiology of the Gastrointestinal Tract.* 2012. p. 1341-1360.

GORELICK, F.S., LERCH, M.M. Do Animal Models of Acute Pancreatitis Reproduce Human Disease? *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, v 4, n 2, p. 251–262, Sep 2017. Disponível em: <http://dx.doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.05.007>

Goyal S, Sakhuja P. Autoimmune pancreatitis: Current perspectives. *Indian J Pathol Microbiol.* 2021 Jun;64(Supplement):S149-S159. doi: 10.4103/ijpm.ijpm_59_21. PMID: 34135159.

Gözde Ece Karaman, E. E.-A., Serap Akyüz (2020). Zebrafish; an emerging model organism for studying toxicity and biocompatibility of dental materials. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2020 Dec 31;66(8):41-46.

Griesbacher T, Rainer I, Heinemann A, Groisman D. Haemodynamic and exocrine effects of caerulein at submaximal and supramaximal levels on the rat pancreas: role of cholecystokinin receptor subtypes. *Pancreatology.* 2006;6(1-2):65-75; discussion 75-6. doi: 10.1159/000090025. Epub 2005 Dec 2. PMID: 16327284.

Griffin, A., C. Krasniak and S. C. Baraban (2016). "Advancing epilepsy treatment through personalized genetic zebrafish models." *Prog Brain Res* 226: 195-207.

Guerreiro, Luiz H. et al. Amylin induces hypoglycemia in mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* [online]. 2013, v. 85, n. 1 [Accessed 18 July 2021], pp. 349-354. Available from: <<https://doi.org/10.1590/S0001-37652013005000011>>. Epub 01 Mar 2013. ISSN 1678-2690. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652013005000011>.

Guo, S. (2009). "Using zebrafish to assess the impact of drugs on neural development and function." *Expert Opin Drug Discov* 4(7): 715-726.

Gut P, Baeza-Raja B, Andersson O, Hasenkamp L, Hsiao J, Hesselson D, Akassoglou K, Verdin E, Hirschey MD, Stainier DY . Whole-organism screening for gluconeogenesis identifies activators of fasting metabolism. *Nat Chem Biol.* 9(2):97-104, 2013.

Gut P, Reischauer S, Stainier DYR, Arnaout R. LITTLE FISH, BIG DATA: ZEBRAFISH AS A MODEL FOR CARDIOVASCULAR AND METABOLIC DISEASE. *Physiol Rev.* 2017 Jul 1;97(3):889-938. doi: 10.1152/physrev.00038.2016. PMID: 28468832; PMCID: PMC5817164.

Gut, P., S. Reischauer, D. Y. R. Stainier and R. Arnaout (2017). "LITTLE FISH, BIG DATA: ZEBRAFISH AS A MODEL FOR CARDIOVASCULAR AND METABOLIC DISEASE." *Physiological reviews* 97(3): 889-938.

Habtezion A, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Acute Pancreatitis: A Multifaceted Set of Organelle and Cellular Interactions. *Gastroenterology.* 2019;156(7):1941-1950. doi:10.1053/j.gastro.2018.11.082

Hegyi P, Petersen OH. The exocrine pancreas: the acinar-ductal tango in physiology and pathophysiology. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2013;165:1-30. doi: 10.1007/112_2013_14. PMID: 23881310.

Hess HJ. Agents Affecting Gastrointestinal Functions. Academic Press. 1969. v.4, p. 56-66.

HIRANO, T., SALUJA, A., RAMARAO, P. et al, Apical secretion of lysosomal enzymes in rabbit pancreas occurs via a secretagogue regulated pathway and is increased after pancreatic duct obstruction. *J Clin Invest*, v 87, p.865–869, 1991.

Hobbs, C. A., C. Swartz, R. Maronpot, J. Davis, L. Recio and S. Hayashi (2012). "Evaluation of the genotoxicity of the food additive, gum ghatti." *Food and Chemical Toxicology* 50(3-4): 854-860.

Howe, K., Clark, M., Torroja, C. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503 (2013). <https://doi.org/10.1038/nature12111>

Howarth, D. L., C. Yin, K. Yeh and K. C. Sadler (2013). "Defining hepatic dysfunction parameters in two models of fatty liver disease in zebrafish larvae." *Zebrafish* 10(2): 199-210.

Huyseune, A., C. Van der heyden and J. Y. Sire (1998). "Early development of the zebrafish (*Danio rerio*) pharyngeal dentition (Teleostei, Cyprinidae)." *Anat Embryol (Berl)* 198(4): 289-305.

Imrani K, Lahfidi A, Jerguigue H, Latib R, Omor Y. Autoimmune pancreatitis presenting as a pancreatic head mass. *Radiol Case Rep.* 2021;16(8):2017-2020. Published 2021 Jun 8. doi:10.1016/j.radcr.2021.05.017

In't Veld P., Marichal M. (2010) Microscopic Anatomy of the Human Islet of Langerhans. In: Islam M. (eds) *As Ilhotas de Langerhans. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 654. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3271-3_1

In't Veld, P. and M. Marichal (2010). Microscopic Anatomy of the Human Islet of Langerhans. *The Islets of Langerhans*. M. S. Islam. Dordrecht, Springer Netherlands: 1-19.

Ismail OZ, Bhayana V. Lipase or amylase for the diagnosis of acute pancreatitis? *Clin Biochem.* 2017 Dec;50(18):1275-1280. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2017.07.003. Epub 2017 Jul 16. PMID: 28720341.

Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. *Development*. 2013;140(12):2463-2467. doi:10.1242/dev.083147

Janah L, Kjeldsen S, Galsgaard KD, Winther-Sørensen M, Stojanovska E, Pedersen J, Knop FK, Holst JJ, Wewer Albrechtsen NJ. Glucagon Receptor Signaling and Glucagon Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(13):3314. <https://doi.org/10.3390/ijms20133314>

Javed MA, Wen L, Awais M, Latawiec D, Huang W, Chvanov M, Schaller S, Bordet T, Michaud M, Pruss R, Tepikin A, Criddle D, Sutton R. TRO40303 Ameliorates Alcohol-Induced Pancreatitis Through Reduction of Fatty Acid Ethyl Ester-Induced Mitochondrial Injury and Necrotic Cell Death. *Pancreas*. 2018 Jan;47(1):18-24. doi: 10.1097/MPA.0000000000000953. PMID: 29200128; PMCID: PMC5753827.

Jayawardena D, Guzman G, Gill RK, Alrefai WA, Onyuksel H, Dudeja PK. Expression and localization of VPAC1, the major receptor of vasoactive intestinal peptide along the length of the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2017;313(1):G16-G25. doi:10.1152/ajpgi.00081.2017

Jeong, J. Y., H. B. Kwon, J. C. Ahn, D. Kang, S. H. Kwon, J. A. Park and K. W. Kim (2008). "Functional and developmental analysis of the blood-brain barrier in zebrafish." *Brain Res Bull* 75(5): 619-628.

Jiang Z., Song J., Qi F., Xiao A., An X., Liu Na., et al. Exdpf é um regulador chave do desenvolvimento do pâncreas exócrino controlado por ácido retinoico e ptf1a em peixe-zebra. *PLoS Biol* 6(11): e293, 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060293>

Jing L, Zon LI. Zebrafish as a model for normal and malignant hematopoiesis. *Dis Model Mech*. 2011;4(4):433-438. doi:10.1242/dmm.006791

Jo, S. I., J. H. Chang, T. H. Kim, C. W. Kim, J. K. Kim and S. W. Han (2019). "Subsets associated with developing acute pancreatitis in patients with severe hypertriglyceridemia and the severity of pancreatitis." *Pancreatology* 19(6): 795-800.

Johnson CD, Abu-Hilal M. Persistent organ failure during the first week as a marker of fatal outcome in acute pancreatitis. *Gut*. 2004 Sep;53(9):1340-4. doi: 10.1136/gut.2004.039883. PMID: 15306596; PMCID: PMC1774183.

Jonsson J., Carlsson L., Edlund T., Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371: 606–609, 1994.

Jonz MG, Fearon IM, Nurse CA. Neuroepithelial oxygen chemoreceptors of the zebrafish gill. *J Physiol*. 2004;560(Pt 3):737-752. doi:10.1113/jphysiol.2004.069294

Jubb KVF, Stent AW. Pancreas. Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 2 (Sixth Edition). 2016. p. 353-375.e1.

Kalueff, A. V., A. M. Stewart and R. Gerlai (2014). "Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders." *Trends Pharmacol Sci* 35(2): 63-75.

Khan, K. M., A. D. Collier, D. A. Meshalkina, E. V. Kysil, S. L. Khatsko, T. Kolesnikova, Y. Y. Morzherin, J. E. Warnick, A. V. Kalueff and D. J. Echevarria (2017). "Zebrafish models in neuropsychopharmacology and CNS drug discovery." *British journal of pharmacology* 174(13): 1925-1944.

Kim I, Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Dec;7(12):1013-30. doi: 10.1038/nrd2755. PMID: 19043451.

Kim, S. J., H. Kang, E. J. Kim, Y. S. Kim and J. H. Cho (2020). "Clinical features and outcomes of hypertriglyceridemia-induced acute pancreatitis: Propensity score matching analysis from a prospective acute pancreatitis registry." *Pancreatology* 20(4): 617-621.

Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann and T. F. Schilling (1995). "Stages of embryonic development of the zebrafish." *Dev Dyn* 203(3): 253-310.

Kimmel, R., Dobler, S., Schmitner, N. et al. Diabetic pdx1-mutant zebrafish show conserved responses to nutrient overload and anti-glycemic treatment. *Sci Rep* 5, 14241, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep14241>

Kinkel, M. D. and V. E. Prince (2009). "On the diabetic menu: Zebrafish as a model for pancreas development and function." *BioEssays* 31(2): 139-152.

Kinth, P., G. Mahesh and Y. Panwar (2013). "Mapping of zebrafish research: a global outlook." *Zebrafish* 10(4): 510-517.

Kleinert M, Sachs S, Habegger KM, Hofmann SM, Müller TD. Glucagon Regulation of Energy Expenditure. *Int J Mol Sci.* 2019;20(21):5407. Published 2019 Oct 30. doi:10.3390/ijms20215407

Korzh, V., Sleptsova, I., Liao, J., He, J., and Gong, Z. Expression of zebrafish bHLH genes *ngn1* and *nrd* defines distinct stages of neural differentiation. *Dev. Dynam*, 213, 92–104, 1998.

Koutroumpakis, E., A. Slivka, A. Furlan, A. K. Dasyam, A. Dudekula, J. B. Greer, D. C. Whitcomb, D. Yadav and G. I. Papachristou (2017). "Management and outcomes of acute pancreatitis patients over the last decade: A US tertiary-center experience." *Pancreatology* 17(1): 3.

Kroeger, P. T., Jr. and R. A. Wingert (2014). "Using zebrafish to study podocyte genesis during kidney development and regeneration." *Genesis* 52(9): 771-792.

Kubisch, C.H., Sans, M.D., Arumugam, T., Ernst, S.A., Williams, J.A., Logsdon, C.D. Early activation of endoplasmic reticulum stress is associated with arginine-induced

acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 Aug;291(2):G238-45. doi: 10.1152/ajpgi.00471.2005. Epub 2006 Mar 30. PMID: 16574987.

Kui, B., Balla, Z., Végh, E.T., Pallagi, .P, Venglovecz V, Iványi B, Takács T, Hegyi P, Rakonczay Z Jr. Recent advances in the investigation of pancreatic inflammation induced by large doses of basic amino acids in rodents. *Lab Invest*. 2014 Feb;94(2):138-49. doi: 10.1038/labinvest.2013.143. Epub 2013 Dec 23. PMID: 24365745.

Kwon, R.Y., Watson, C.J., Karasik, D. Using zebrafish to study skeletal genomics. *Osso* . 2019; 126: 37-50. doi: 10.1016 / j.bone.2019.02.009

Lampel M, Kern HF. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. 1977 Mar 11;373(2):97-117. doi: 10.1007/BF00432156. PMID: 139754.

Lampel, M., Kern, H. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of pancreatic secretagogue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, v 373, p. 97–117,1977.

Laychock, S.G. Insulin Receptor Signaling. *Encyclopedia of Hormones*. 2003, 368-380.22224779; PMID: PMC3513328.

Lawrence, C. (2007). "The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review." *Aquaculture* 269(1): 1-20.

Lawson, N.D., Weinstein, B.M. In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol*. 2002 Aug 15;248(2):307-18. doi: 10.1006/dbio.2002.0711. PMID: 12167406.

Lee, G.H., Cheng, N.W., Yu, H.H, et al. A novel zebrafish model to emulate lung injury by folate deficiency-induced swim bladder defectiveness and protease/antiprotease expression imbalance. *Sci Rep*. 2019;9(1):12633. Published 2019 Sep 2. doi:10.1038/s41598-019-49152-7

Lee, P.J., Papachristou, G.I. New insights into acute pancreatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16, 479–496 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0158-2>

Leite, C. E., C. Teixeira Ada, F. F. Cruz, S. C. Concato, J. H. Amaral, C. D. Bonan, M. M. Campos, F. B. Morrone and A. M. Battastini (2012). "Analytical method for determination of nitric oxide in zebrafish larvae: toxicological and pharmacological applications." *Anal Biochem* 421(2): 534-540.

Lerch, M.M., Weidenbach, H., Gress, T.M., Adler, G. Effect of kinin inhibition in experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol.* 1995 Oct;269(4 Pt 1):G490-9. doi: 10.1152/ajpgi.1995.269.4.G490. PMID: 7485500.

Lerch, M.M., Saluja, A.K., Dawra, R. et al, Acute necrotizing pancreatitis in the opossum: earliest morphological changes involve acinar cells. *Gastroenterology.* V 103, p. 205–213, 1992.

Lerch, Markus M. et al. Models of Acute and Chronic Pancreatitis. *Gastroenterology*, 2013, 144(6): p. 1180 – 1193. 2013.

Leung, P.S. (2010) Overview of the Pancreas. In: *The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas.* Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 690. Springer, Dordrecht. doi:10.1007/978-90-481-9060-7.

Leung, P.S., Ip, S.P. Pancreatic acinar cell: its role in acute pancreatitis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(7):1024-30. doi: 10.1016/j.biocel.2005.12.001. Epub 2005 Dec 28. PMID: 16423553.

Leung PS. The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas. *J Physiol.* 2007;580(Pt 1):31-37. doi:10.1113/jphysiol.2006.126193

Liao TH, Hamosh P, Hamosh M. Fat digestion by lingual lipase: mechanism of lipolysis in the stomach and upper small intestine. *Pediatr Res*. 1984 May;18(5):402-9. doi: 10.1203/00006450-198405000-00002. PMID: 6728567.

Lin, Yung-Yao. Muscle diseases in the Zebrafish. *Neuromuscular Disorders*, Volume 22, Issue 8, 673 – 684

Logsdon RD. Pancreatic Enzyme Secretion (Physiology). *Encyclopedia of Gastroenterology*, 2004, p. 68-75. Lu, J.-W., Y.-J. Ho, Y.-J. Yang, H.-A. Liao, S.-C. Ciou, L.-I. Lin and D.-L. Ou (2015). "Zebrafish as a disease model for studying human hepatocellular carcinoma." *World journal of gastroenterology* 21(42): 12042-12058.

Lukinius A, Wilander E, Westermark GT, Engström U, Westermark P. Co-localization of islet amyloid polypeptide and insulin in the B cell secretory granules of the human pancreatic islets. *Diabetologia*. 1989 Apr;32(4):240-4. doi: 10.1007/BF00285291. PMID: 2668077.

Mahmoud, A. A. T., G. M. Hassan, A. M. S. Hassan, A. Latif and M. F. Ramadan (2015). "Demonstrating adverse effects of a common food additive (sodium sulfite) on biochemical, cytological and histopathological parameters in tissues of albino Wister rats." *European Journal of Integrative Medicine* 7(3): 234-242.

Mareninova OA, Sung KF, Hong P, Lugea A, Pandol SJ, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Cell death in pancreatitis: caspases protect from necrotizing pancreatitis. *J Biol Chem*. 2006 Feb 10;281(6):3370-81. doi: 10.1074/jbc.M511276200. Epub 2005 Dec 8. PMID: 16339139.

Mastoraki A, Tzortzopoulou A, Tsela S, Danias N, Sakorafas G, Smyrniotis V, Arkadopoulos N. Hereditary pancreatitis: dilemmas in differential diagnosis and therapeutic approach. *J Gastrointest Cancer*. 2014 Mar;45(1):22-6. doi: 10.1007/s12029-013-9559-6. PMID: 24242859.

Maves L. Recent advances using zebrafish animal models for muscle disease drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2014;9(9):1033-1045. doi:10.1517/17460441.2014.927435

McClure, M. M., P. B. McIntyre and A. R. McCune (2006). "Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*." *Journal of Fish Biology* 69(2): 553-570.

McGuckin, Ellen et al. The pancreas. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, Volume 21, Issue 11, 604 – 610. 2020.

Menke AL, Spitsbergen JM, Wolterbeek APM, Woutersen RA. Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish. *Toxicologic Pathology.* 2011;39(5):759-775.

Meyers, J. R. (2018). "Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism." *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* 16(1): e19.

Mierzwa AS, Nguyen F, Xue M, Jonz MG. Regeneration of the gill filaments and replacement of serotonergic neuroepithelial cells in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Respir Physiol Neurobiol.* 2020 Mar;274:103366. doi: 10.1016/j.resp.2019.103366. Epub 2019 Dec 30. PMID: 31899351.

Mofidi R, Duff MD, Wigmore SJ, Madhavan KK, Garden OJ, Parks RW. Association between early systemic inflammatory response, severity of multiorgan dysfunction and death in acute pancreatitis. *Br J Surg.* 2006 Jun;93(6):738-44. doi: 10.1002/bjs.5290. PMID: 16671062.

Mosko, J. D., D. A. Leiman, G. A. Ketwaroo and N. Gupta (2020). *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 18(2): 272-275.e275.

Mosztbacher, D., L. Hanák, N. Farkas, A. Szentesi, A. Mikó, J. Bajor, P. Sarlós, J. Czimmer, Á. Vincze, P. J. Hegyi, B. Erőss, T. Takács, L. Czakó, B. C. Németh, F. Izbéki, A. Halász, L. Gajdán, J. Hamvas, M. Papp, I. Földi, K. E. Fehér, M. Varga, K.

Csefkó, I. Török, H. P. Farkas, A. Mickevicius, E. R. Maldonado, V. Sallinen, J. Novák, A. T. Ince, S. Galeev, B. Bod, J. Sümegi, P. Pencik, Z. Dubravcsik, D. Illés, S. Gódi, B. Kui, K. Márta, D. Pécsi, P. Varjú, Z. Szakács, E. Darvasi, A. Párniczky and P. Hegyi (2020). "Hypertriglyceridemia-induced acute pancreatitis: A prospective, multicenter, international cohort analysis of 716 acute pancreatitis cases." *Pancreatology* 20(4): 608-616.

Murtaugh LC, Keefe MD. Regeneration and repair of the exocrine pancreas. *Annu Rev Physiol.* 2015;77:229-249. doi:10.1146/annurev-physiol-021014-071727.

Murtha JM, Qi W, Keller ET. Hematologic and serum biochemical values for zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Med.* 2003 Feb;53(1):37-41. PMID: 12625505.

Niederau C, Ferrell LD, Grendell JH. Caerulein-induced acute necrotizing pancreatitis in mice: protective effects of proglumide, benzotript, and secretin. *Gastroenterology.* 1985 May;88(5 Pt 1):1192-204. doi: 10.1016/s0016-5085(85)80079-2. PMID: 2984080.

Nik, S. H. M., K. Croft, T. A. Mori and M. Lardelli (2014). "The Comparison of Methods for Measuring Oxidative Stress in Zebrafish Brains." *Zebrafish* 11(3): 248-254.

Nøjgaard C, Becker U, Matzen P, Andersen JR, Holst C, Bendtsen F. Progression from acute to chronic pancreatitis: prognostic factors, mortality, and natural course. *Pancreas.* 2011 Nov;40(8):1195-200. doi: 10.1097/MPA.0b013e318221f569. PMID: 21926938.

Norman AW, Henry HL. *Pancreatic Hormones: Insulin and Glucagon. Hormones (Third Edition).* 2015. Chapter 6, p 109-139.

Ober E.A., Field H.A., Stainier D.Y. From endoderm formation to liver and pancreas development in zebrafish. *Mech Dev.* Jan;120(1):5-18,2003. doi: 10.1016/s0925-4773(02)00327-1. PMID: 12490292.

Peery AF, Dellon ES, Lund J, Crockett SD, McGowan CE, Bulsiewicz WJ, Gangarosa LM, Thiny MT, Stizenberg K, Morgan DR, Ringel Y, Kim HP, DiBonaventura MD, Carroll CF, Allen JK, Cook SF, Sandler RS, Kappelman MD, Shaheen NJ. Burden of gastrointestinal disease in the United States: 2012 update. *Gastroenterology*. 2012 Nov;143(5):1179-1187.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2012.08.002. Epub 2012 Aug 8. PMID: 22885331; PMCID: PMC3480553.

Persaud HJ, Hauge-Evans AC, Jones PM. Insulin-Secreting Cell Lines: Potential for Research and Diabetes Therapy. *Cellular Endocrinology in Health and Disease*, 2014. Chapter 15, p. 239-256.

Petejova N, Martinek A. Acute kidney injury following acute pancreatitis: A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2013 Jun;157(2):105-13. doi: 10.5507/bp.2013.048. Epub 2013 Jun 17. PMID: 23774848.

Petersen OH, Gerasimenko J, Gerasimenko OV, Gryshchenko O, Peng S. The Roles of Calcium and ATP in the Physiology and Pathology of the Exocrine Pancreas. *Physiol Rev*. 2021 May 5. doi: 10.1152/physrev.00003.2021. Epub ahead of print. PMID: 33949875.

Petersen OH, Sutton R. Ca²⁺ signalling and pancreatitis: effects of alcohol, bile and coffee. *Trends Pharmacol Sci*. 2006 Feb;27(2):113-20. doi: 10.1016/j.tips.2005.12.006. Epub 2006 Jan 6. PMID: 16406087.

Petrov, M. S. and D. Yadav (2019). "Global epidemiology and holistic prevention of pancreatitis." *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 16(3): 175-184.

Pitchai, A., R. K. Rajaretinam and J. L. Freeman (2019). "Zebrafish as an Emerging Model for Bioassay-Guided Natural Product Drug Discovery for Neurological Disorders." *Medicines (Basel)* 6(2).

Prince, V. E., R. M. Anderson and G. Dalgin (2017). "Zebrafish Pancreas Development and Regeneration: Fishing for Diabetes Therapies." *Curr Top Dev Biol* 124: 235-276.

Prince, V. E., R. M. Anderson and G. Dalgin (2017). Chapter Seven - Zebrafish Pancreas Development and Regeneration: Fishing for Diabetes Therapies. *Current Topics in Developmental Biology*. K. C. Sadler, Academic Press. 124: 235-276.

Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Dósa S, Iványi B, Jármay K, Biczó G, Hracskó Z, Varga IS, Karg E, Kaszaki J, Varró A, Lonovics J, Boros I, Gukovsky I, Gukovskaya AS, Pandol SJ, Takács T. A new severe acute necrotizing pancreatitis model induced by L-ornithine in rats. *Crit Care Med*. 2008 Jul;36(7):2117-27. doi: 10.1097/CCM.0b013e31817d7f5c. PMID: 18594222; PMCID: PMC6624069.

Rami Khoriaty, Nancy Vogel, Mark J. Hoenerhoff, M. Dolors Sans, Guojing Zhu, Lesley Everett, Bradley Nelson, Haritha Durairaj, Brooke McKnight, Bin Zhang, Stephen A. Ernst, David Ginsburg, and John A. Williams. SEC23B is required for pancreatic acinar cell function in adult mice. *Molecular Biology of the Cell* 2017 28:15, 2146-2154.

Raraty M. et al. Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000; 97: 13126-13131.

Reed, B. and M. Jennings (2011). *Guidance on the housing and care of zebrafish Danio rerio*. Horsham, Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA).

Roberts, R. and Ellis, A. (2012). *The Anatomy and Physiology of Teleosts*. In *Fish Pathology*, R.J. Roberts (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9781118222942.ch2>

Rodrigues CG, Pereira E, Caldeira A, Santos A, Sousa H, Banhudo A. Ecoendoscopia digestiva na prática clínica parte IIa – utilidade na avaliação do pâncreas. *GE Jornal Português de Gastreenterologia*. 2014. v.21(2), p. 60-74.

Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jul;8(7):519-29. doi: 10.1038/nrm2199. PMID: 17565364.

Rorsman P, Huising MO. The somatostatin-secreting pancreatic δ -cell in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(7):404-414. doi:10.1038/s41574-018-0020-6.

Rosa, C. E., M. A. Figueiredo, C. F. C. Lanes, D. V. Almeida, J. M. Monserrat and L. F. Marins (2008). "Metabolic rate and reactive oxygen species production in different genotypes of GH-transgenic zebrafish." *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 149(1): 209-214.

Rowena, S., A. Rebecca and C. Smith (2007). "Oviposition Decisions Are Mediated by Spawning Site Quality in Wild and Domesticated Zebrafish, *Danio rerio*." *Behaviour* 144(8): 953-966.

Sadler, K. C., J. F. Rawls and S. A. Farber (2013). "Getting the inside tract: new frontiers in zebrafish digestive system biology." *Zebrafish* 10(2): 129-131.

Sahin, N., B. Pirinc and S. Turkoglu (2015). "In vivo GENOTOXICITY ASSESSMENT OF SOME FOOD PRESERVATIVES IN *Drosophila melanogaster* WITH THE COMET ASSAY." *Fresenius Environmental Bulletin* 24(6A): 2138-2145.

Saisho, Y., A. E. Butler, J. J. Meier, T. Monchamp, M. Allen-Auerbach, R. A. Rizza and P. C. Butler (2007). "Pancreas volumes in humans from birth to age one hundred taking into account sex, obesity, and presence of type-2 diabetes." *Clinical anatomy (New York, N.Y.)* 20(8): 933-942.

Sakhneny, L., L. Khalifa-Malka and L. Landsman (2019). "Pancreas organogenesis: Approaches to elucidate the role of epithelial-mesenchymal interactions." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 92: 89-96.

Santoro, M. M. (2014). "Zebrafish as a model to explore cell metabolism." *Trends Endocrinol Metab* 25(10): 546-554.

Sarasamma S, Varikkodan MM, Liang ST, Lin YC, Wang WP, Hsiao CD. Zebrafish: A Premier Vertebrate Model for Biomedical Research in Indian Scenario. *Zebrafish*. 2017 Dec;14(6):589-605. doi: 10.1089/zeb.2017.1447. Epub 2017 Oct 12. PMID: 29023224.

Sastre J, Sabater L, Aparisi L. Fisiología de la secreción pancreática. *Gastroenterología y Hepatología*. 2005. V (28), Supplement 1, p. 3-9.

Sehring IM, Weidinger G. Recent advancements in understanding fin regeneration in zebrafish. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2020 Jan;9(1):e367. doi: 10.1002/wdev.367. Epub 2019 Nov 14. PMID: 31726486.

Sekiguchi T. Caerulein. *Handbook of Hormones*. Subchapter 20C. 2016. p. 179-e20C-2.

Sekiguchi T. Cholecystokinin. *Handbook of Hormones*. 2016. p. 177-e20B-3.

Shin, J. T. and M. C. Fishman (2002). "From Zebrafish to human: modular medical models." *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3: 311-340.

Si-Tayeb, K., F. P. Lemaigre and S. A. Duncan (2010). "Organogenesis and development of the liver." *Dev Cell* 18(2): 175-189.

Singhi AD, Pai RK, Kant JA, Bartholow TL, Zeh HJ, Lee KK, Wijkstrom M, Yadav D, Bottino R, Brand RE, Chennat JS, Lowe ME, Papachristou GI, Slivka A, Whitcomb DC, Humar A. The histopathology of PRSS1 hereditary pancreatitis. *Am J Surg Pathol*. 2014 Mar;38(3):346-53. doi: 10.1097/PAS.000000000000164. PMID: 24525505; PMCID: PMC4321743.

Smith RC, Southwell-Keely J, Chesher D. Should serum pancreatic lipase replace serum amylase as a biomarker of acute pancreatitis? *ANZ J Surg*. 2005 Jun;75(6):399-404. doi: 10.1111/j.1445-2197.2005.03391.x. PMID: 15943725.

Staudt, D. and D. Stainier (2012). "Uncovering the molecular and cellular mechanisms of heart development using the zebrafish." *Annu Rev Genet* 46: 397-418.

Steele, S. L., S. V. Prykhozhiy and J. N. Berman (2014). "Zebrafish as a model system for mitochondrial biology and diseases." *Transl Res* 163(2): 79-98.

Stigliano, S., H. Sternby, E. de Madaria, G. Capurso and M. S. Petrov (2017). "Early management of acute pancreatitis: A review of the best evidence." *Digestive and Liver Disease* 49(6): 585-594.

Streisinger, G., Walker, C., Dower, N. et al. Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 291, 293–296, 1981, 1981. doi: 10.1038/291293a0.

Sun, H., J. Tian and J. Li (2020). "MiR-92b-3p ameliorates inflammation and autophagy by targeting TRAF3 and suppressing MKK3-p38 pathway in caerulein-induced AR42J cells." *International Immunopharmacology* 88: 106691.

Sundin, J., R. Morgan, M. H. Finnøen, A. Dey, K. Sarkar and F. Jutfelt (2019). "On the Observation of Wild Zebrafish (*Danio rerio*) in India." *Zebrafish* 16(6): 546-553.

Szabo, F. K., L. Hornung, J.-A. Oparaji, R. Alhosh, S. Z. Husain, Q. Y. Liu, J. Palermo, T. K. Lin, J. D. Nathan, D. J. Podberesky, M. Lowe, L. Fei and M. Abu-El-Haija (2016). "A prognostic tool to predict severe acute pancreatitis in pediatrics." *Pancreatology* 16(3): 358-3.

Takvam, M., C. M. Wood, H. Kryvi and T. O. Nilsen (2021). "Ion Transporters and Osmoregulation in the Kidney of Teleost Fishes as a Function of Salinity." *Front Physiol* 12: 664588.

Tang YM, Chen TW, Bollen TL, Wang YX, Xue HD, Jin ZY, Huang XH, Xiao B, Li XH, Yi Ji F, Zhang XM. MR imaging of hemorrhage associated with acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2018. 18(4): p. 363-369.

ULMASOV, B., OSHIMA, K., RODRIGUEZ, M.G., COX, R.D., NEUSCHWANDER-TETRI, B.A. Differences in the degree of cerulein-induced chronic pancreatitis in C57BL/6 mouse substrains lead to new insights in identification of potential risk factors in the development of chronic pancreatitis. *Am J Pathol.*, v 183 , p. 692–708, 2013.

van de Venter, M., J. Didloff, S. Reddy, B. Swanepoel, S. Govender, N. S. Dambuza, S. Williams, T. C. Koekemoer and L. Venables (2020). "Wild-Type Zebrafish (*Danio rerio*) Larvae as a Vertebrate Model for Diabetes and Comorbidities: A Review." *Animals (Basel)* 11(1).

Vasconcelos, S. M. L., M. O. F. Goulart, J. B. d. F. Moura, V. Manfredini, M. d. S. Benfato and L. T. Kubota (2007). "Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação." *Química Nova* 30: 1323-1338.

Verkerk, A. and C. A. Remme (2012). "Zebrafish: a novel research tool for cardiac (patho)electrophysiology and ion channel disorders." *Frontiers in Physiology* 3(255).

Vlachou PA, Khalili K, Jang HJ, Fischer S, Hirschfield GM, Kim TK. IgG4-related sclerosing disease: autoimmune pancreatitis and extrapancreatic manifestations. *Radiographics*. 2011 Sep-Oct;31(5):1379-402. doi: 10.1148/rg.315105735. PMID: 21918050.

Völzke H, Baumeister SE, Alte D, Hoffmann W, Schwahn C, Simon P, John U, Lerch MM. Independent risk factors for gallstone formation in a region with high cholelithiasis prevalence. *Digestion*. 2005;71(2):97-105. doi: 10.1159/000084525. Epub 2005 Mar 16. PMID: 15775677.

Vonlaufen, A., Wilson, J.S. and Apte, M.V. (2008), Molecular mechanisms of pancreatitis: Current opinion. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 23: 1339-1348. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05520.x>

Voronina S, Longbottom R, Sutton R, Petersen OH, Tepikin A. Bile acids induce calcium signals in mouse pancreatic acinar cells: implications for bile-induced pancreatic pathology. *J Physiol.* 2002 Apr 1;540(Pt 1):49-55. doi: 10.1113/jphysiol.2002.017525. PMID: 11927668; PMCID: PMC2290202.

Wallace, K. N. and M. Pack (2003). "Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish." *Developmental Biology* 255(1): 12-29.

Wallace, K. N., S. Akhter, E. M. Smith, K. Lorent and M. Pack (2005). "Intestinal growth and differentiation in zebrafish." *Mechanisms of Development* 122(2): 157-173.

Wang X, Zielinski MC, Misawa R, et al. Quantitative analysis of pancreatic polypeptide cell distribution in the human pancreas. *PLoS One.* 2013;8(1):e55501. doi:10.1371/journal.pone.0055501

Washabau RJ, Day MJ. Pancreas. *Canine and Feline Gastroenterology.* 2013, 799-848.

Weidenbach H, Lerch MM, Gress TM, Pfaff D, Turi S, Adler G. Vasoactive mediators and the progression from oedematous to necrotising experimental acute pancreatitis. *Gut.* 1995 Sep;37(3):434-40. doi: 10.1136/gut.37.3.434. PMID: 7590444; PMCID: PMC1382829.

Weigle J, Franz-Odenaal TA. Functional bone histology of zebrafish reveals two types of endochondral ossification, different types of osteoblast clusters and a new bone type. *J Anat.* 2016 Jul;229(1):92-103. doi: 10.1111/joa.12480. PMID: 27278890; PMCID: PMC5341596.

Weiss FU, Halangk W, Lerch MM. New advances in pancreatic cell physiology and pathophysiology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2008;22(1):3-15. doi: 10.1016/j.bpg.2007.10.017. PMID: 18206809.

Weiss M, Steiner DF, Philipson LH. Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships. 2014 Feb 1. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A,

Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Hofland J, Kalra S, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W, Laferrère B, McGee EA, McLachlan R, Morley JE, New M, Purnell J, Sahay R, Singer F, Stratakis CA, Trence DL, Wilson DP, editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000–. PMID: 25905258.

Wendik B., Maier E., Meyer D. Zebrafish *mnx* genes in endocrine and exocrine pancreas formation. *Dev Biol.* Apr 15; 268 (2): 372-83, 2004. doi: 10.1016/j.ydbio.2003.12.026. PMID: 15063174.

Wendik B., Maier E., Meyer D. Zebrafish *mnx* genes in endocrine and exocrine pancreas formation. *Dev Biol.* Apr 15; 268 (2): 372-83, 2004. doi: 10.1016/j.ydbio.2003.12.026. PMID: 15063174.

Westermarck P, Andersson A, Westermarck GT. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiol Rev.* 2011 Jul;91(3):795-826. doi: 10.1152/physrev.00042.2009. PMID: 21742788.

Whitley EM. Comparative Pancreatic Pathology. *Pathobiology of Human Disease.* 2014, 1101-1123.

Wilkins, B. J. and M. Pack (2013). "Zebrafish models of human liver development and disease." *Compr Physiol* 3(3): 1213-1230.

Willemer S, Elsässer HP, Adler G. Hormone-induced pancreatitis. *Eur Surg Res.* 1992;24 Suppl 1:29-39. doi: 10.1159/000129237. PMID: 1601022.

Williams JA, Korc M, Dormer RL. Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini. *Am J Physiol.* 1978 Nov;235(5):517-24. doi: 10.1152/ajpendo.1978.235.5.E517. PMID: 215042.

With autoimmune pancreatitis. *Eur J Radiol.* 2010 Nov;76(2):228-38. doi: 10.1016/j.ejrad.2009.06.010. Epub 2009 Jul 5. PMID: 19581062.

Wu, S. Y., W. Y. Yang, C. C. Cheng, K. H. Lin, B. P. Sampurna, S. M. Chan and C. H. Yuh (2020). "Low molecular weight fucoidan inhibits hepatocarcinogenesis and nonalcoholic fatty liver disease in zebrafish via ASGR/STAT3/HNF4A signaling." *Clin Transl Med* 10(8): e252.

Xiao AY, Tan ML, Wu LM, Asrani VM, Windsor JA, Yadav D, Petrov MS. Global incidence and mortality of pancreatic diseases: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression of population-based cohort studies. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2016 Sep;1(1):45-55. doi: 10.1016/S2468-1253(16)30004-8. Epub 2016 Jun 28. PMID: 28404111.

Yang X, Yao L, Fu X, Mukherjee R, Xia Q, Jakubowska MA, Ferdek PE, Huang W. Experimental Acute Pancreatitis Models: History, Current Status, and Role in Translational Research. *Front Physiol.* 2020 Dec 23;11:614591. doi: 10.3389/fphys.2020.614591.

Yee N.S., Pack M. Zebrafish as a Model for Pancreatic Cancer Research. In: Su G.H. (eds) *Pancreatic Cancer. Methods in Molecular Medicine.* Humana Press, vol 103, 2005. <https://doi.org/10.1385/1-59259-780-7:273>

Yee, N.S., Yusuff, S. and Pack, M., Zebrafish pdx1 morphant displays defects in pancreas development and digestive organ chirality, and potentially identifies a multipotent pancreas progenitor cell. *Genesis*, 30: 137-140, 2001. <https://doi.org/10.1002/gene.1049>

Yuan Q, Pan A, Fu Y, Dai Y. Anatomy and physiology of the pancreas. *Integrative Pancreatic Intervention Therapy.* 2021, 3-21.

Zhan X, Wang F, Bi Y, Ji B. Animal models of gastrointestinal and liver diseases. Animal models of acute and chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2016;311(3):G343-G355. doi:10.1152/ajpgi.00372.2015

Zhang L, Chari S, Smyrk TC, Deshpande V, Klöppel G, Kojima M, Liu X, Longnecker DS, Mino-Kenudson M, Notohara K, Rodriguez-Justo M, Srivastava A, Zamboni G, Zen Y. Autoimmune pancreatitis (AIP) type 1 and type 2: an international consensus study on histopathologic diagnostic criteria. *Pancreas*. 2011 Nov;40(8):1172-9. doi: 10.1097/MPA.0b013e318233bec5. PMID: 21975436.

Zhang L, Zhang J, Shea K, Xu L, Tobin G, Knapton A, Sharron S, Rouse R. Autophagy in pancreatic acinar cells in caerulein-treated mice: immunolocalization of related proteins and their potential as markers of pancreatitis. *Toxicol Pathol*. 2014;42(2):435-57. doi: 10.1177/0192623313486967. Epub 2013 May 2. PMID: 23640381.

Zhao, X. and M. Pack (2017). "Modeling intestinal disorders using zebrafish." *Methods Cell Biol* 138: 241-270.

Zheng W, Wang Z, Collins JE, Andrews RM, Stemple D, Gong Z. Comparative transcriptome analyses indicate molecular homology of zebrafish swimbladder and mammalian lung. *PLoS One*. 2011;6(8):e24019. doi:10.1371/journal.pone.0024019

Zheng, Z., Y.-X. Ding, Y.-X. Qu, F. Cao and F. Li (2021). "A narrative review of the mechanism of acute pancreatitis and recent advances in its clinical management." *American journal of translational research* 13(3): 833-852.

Zhou, W., R. C. Boucher, F. Bollig, C. Englert and F. Hildebrandt (2010). "Characterization of mesonephric development and regeneration using transgenic zebrafish." *Am J Physiol Renal Physiol* 299(5): F1040-1047.

Zhu, H., L. Huang, S. Zhu, X. Li, Z. Li, C. Yu and X. Yu (2016). "Regulation of autophagy by systemic admission of microRNA-141 to target HMGB1 in l-arginine-induced acute pancreatitis in vivo." *Pancreatology* 16(3): 337-346.

8 ANEXOS

8.1 Aprovação do comitê de ética



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 31 de agosto de 2022

Ofício nº 66/22

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: Prof. . **Ranilson de Souza Bezerra**

Departamento de Bioquímica

Processo nº **0042/2022**

Certificamos que a proposta intitulada "**Alterações Histológicas e Bioquímicas em Pancreatite Aguda Induzida por Caeruleína em Zebrafish (Danio rerio)**", Registrado com o nº**0042/2022** sob a responsabilidade de **Prof. Ranilson de Souza Bezerra** o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 30/08/2022

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/12/2021 a 01/02/2023
Espécie/linhagem/raça	<i>Danio rerio</i> (Zebrafishou Paulistinha)
Nº de animais	100 animais
Peso/Idade	200 g / Adultos
Sexo	Machos (100)
Origem: Biotério de Criação	Loja Recife Aquários PE, inscrita sob o CNPJ 08.537.137/001-91
Destino: Biotério de Experimentação	Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica da UFPE

Atenciosamente

Isvânia M. Serafim S. Lopes
 Vice-Presidente CEUA

 Dra. Isvânia M. Serafim S. Lopes
 Professora Adjunta
 Departamento de Biofísica e Radiobiologia
 UFPE - Universidade Federal de Pernambuco
 SIAPE: 1913075