

CRISTIANE ISABEL SILVA MANGIALARDO RAMOS

ANÁLISE FARMACOLÓGICA COMPARATIVA DA PANCREATITE
EXPERIMENTAL INDUZIDA POR FOSFOLIPASE A₂ SECRETÓRIA DO
VENENO DE SERPENTE *Crotalus durissus terrificus* E FOSFOLIPASE A₂ DE
MAMÍFERO EM RATOS: papel das fibras C e do sulfeto de hidrogênio

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Soraia Kátia Pereira Costa

Versão original

São Paulo
2016

RESUMO

Ramos CISM. Análise farmacológica comparativa da pancreatite experimental induzida por fosfolipase A₂ secretória do veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* e fosfolipase A₂ de mamíferos em ratos: papel das fibras C e do sulfeto de hidrôgeno. [tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

A pancreatite aguda (PA), condição inflamatória do pâncreas caracterizada por dor abdominal e concentrações elevadas de enzimas pancreáticas e outras (ex.: amilase, fosfolipase A₂, FLA₂), representa a principal causa de hospitalização das doenças gastrointestinais. Entretanto, a patogênese da PA continua pouco compreendida e os tratamentos escassos. Nesse sentido, os objetivos deste estudo foram: *i*) avaliar comparativamente os efeitos inflamatórios e algogênicos das FLA₂s secretória do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) e de mamífero (bovino) e, *ii*) determinar mecanismos envolvidos (neurogênicos e dependentes do sulfeto de hidrogênio (H₂S), um recentemente descrito mediador endógeno). A PA foi induzida pela injeção da FLA₂ (300 mg/kg) crotálica ou bovina no ducto biliopancreático de ratos anestesiados e pré-tratados com salina, antagonistas dos receptores NK₁/NK₂ (SR140333/SR48968, e.v., - 15 min) Na₂S (doador de H₂S, i.p., - 30 min) ou propargilglicina (PGly, inibidor da enzima CSE envolvida na síntese endógena de H₂S, i.p., - 30 min). Após 4 horas, a FLA₂ crotálica ou bovina promoveu edema pancreático, infiltração de neutrófilos, amilasemia sérica e hiperalgia abdominal. A FLA₂ crotálica também aumentou a geração de H₂S pancreática, as concentrações séricas de GT-γ e AST e promoveu leucopenia. O SR140333, mas não o SR48968, inibiu a hiperalgia induzida por ambas as FLA₂s, mas não afetou a PA ou índices enzimáticos. Tratamento com a PGly reduziu a PA induzida por ambas as FLA₂, mas inibiu somente a hiperalgia evocada pela FLA₂ bovina. O doador espontâneo de H₂S (Na₂S) reduziu a PA e hiperalgia induzidas pela PLA₂ crotálica, mas não a amilasemia. Conclui-se que ambas as FLA₂s representam ferramentas farmacológicas importantes na indução da PA, pois conseguem mimetizar sinais clássicos da PA em humanos. Em termos mecanísticos, conclui-se que enquanto a ativação do receptor NK₁ consiste num mecanismo comum de regulação da resposta sensitiva abdominal (hiperalgésica) frente as duas FLA₂s, o papel (protetor ou deletério) do H₂S neste modelo ainda não está estabelecido.

Palavras-chave: Pancreatite aguda. Fosfolipase A₂. Sulfeto de Hidrogênio. SR140333. Propargilglicina. Hiperalgia abdominal.

ABSTRACT

Ramos CISM. Comparative pharmacological Analysis of experimental pancreatitis induced secretory phospholipase A₂ from snake venom *Crotalus durissus terrificus* and phospholipase A₂ mammals in rats: role of the C fibers and hydrogen of sulphide. [Ph. D. thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Acute pancreatitis (AP), an inflammatory condition of the pancreas characterized by severe abdominal pain and increased levels of pancreatic enzymes and others in the blood (e.g. amilase, phospholipase A₂, PLA₂), is the leading cause of gastrointestinal hospitalization worldwide. Nevertheless, the pathogenesis of AP still not fully understood and treatments are scant. This study aimed: *i*) to evaluate comparatively the inflammatory and algescic effects of PLA₂ obtained from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (PLA₂ Cdt) snake or mammalian (bovine) and, *ii*) to establish involved mechanisms focusing on neurogenic aspects and the recent gasomediator (hydrogen sulfide, H₂S). AP was induced by the injection of bovine PLA₂ or sPLA₂ from Cdt venom (300 µg/kg) into the common bile duct of anaesthetized rats pretreated with the NK₁ or NK₂ receptor antagonists (SR140333/SR48968, i.v., - 15 min), with the H₂S donor (Na₂S, i.p., - 30 min) or the inhibitor of CSE, an enzyme involved in the endogenous H₂S synthesis (Propargylglycin, PGly i.p., - 30 min). After 4 hours, both mammalian and crotalic PLA₂s caused pancreatic oedema, local neutrophil infiltration, serum hyperamylasemia and abdominal hyperalgesia. Increased pancreatic production of H₂S, serum levels of γ-GT and AST and leukopenia were also observed in Cdt-induced AP. SR140333, but not SR48968, blocked the abdominal hyperalgesia induced by both PLAs but failed to significantly affect the inflammatory response and increased enzymes concentrations in this model. PGly attenuated both mammalian and crotalic PLA₂s-induced AP, but inhibited only the abdominal hyperalgesia evoked by bovine PLA₂. Spontaneous H₂S donor (Na₂S) reduced crotalic PLA₂-induced AP and associated abdominal hyperalgesia but failed to affect hyperamylasemia. In conclusion, both mammalian and crotalic PLA₂ act as an important pharmacological tool since they can mimic signs and symptoms of human AP. Whereas NK₁ receptor (neurogenic mechanism) mediates abdominal hyperalgesia is likely to be the common mechanism involved in AP evoked by both PLA₂s, this study still raising questions regarding the role (protective or deleterious) of H₂S in the pathophysiology of AP and related pain process.

Key words: Acute pancreatitis. Phospholipase A₂. Hydrogen sulfide. SR140333. Propargylglycin. Abdominal hyperalgesia.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais: Anatomia e fisiologia do pâncreas e pancreatite

Do grego “πᾶν” (pan) e “κρέας” (kreas), o termo pâncreas na língua portuguesa, significa “toda carne”, o qual reflete a textura ótica desse órgão referido, pela primeira vez, por *Ruphus de Ephesus* no ano 100 a.C. Atualmente sabe-se tratar de uma glândula anexa mista (exócrina e endócrina) situada posterior ao estômago, numa posição retro peritoneal e fixado à parede abdominal, cuja função principal consiste em produzir o hormônio insulina, além de sintetizar e liberar enzimas capazes de digerir gorduras e proteínas (Ceranowicz et al., 2015).

Anatomicamente o pâncreas possui dois tipos teciduais: (i) ilhotas de Langherans (porção endócrina do pâncreas, que secreta insulina e glucagon diretamente no sangue) e, (ii) células acinares (porção exócrina do pâncreas responsável por produzir e secretar as enzimas digestivas) (Ceranowicz et al., 2015; Pannala, 2009). As células acinares são ricas em ácido ribonucleico (RNA), demonstrando assim a capacidade destas efetuarem a síntese protéica. As enzimas inativadas (pró-enzimas) deixam as cisternas do retículo endoplasmático granular e passam para o aparelho de Golgi, onde são concentradas por eliminação de água, sob a forma de grânulos de secreção, denominados grânulos de zimogênio. Estes se concentram na região proximal à membrana apical da célula.

Os ácinos liberam seus conteúdos granulares nos ductos intralobulares, os quais alcançam os ductos interlobulares e, em seguida, os extralobulares e finalmente, os ductos pancreáticos acessórios e principais (ducto coletor principal). Na sua terminação, o ducto pancreático acopla-se ao colédoco para desembocar no duodeno por um óstio comum, o esfíncter de Oddi (Leung, 2006; Nawrot-Porabka, 2015; Sarles, 1977). Em geral, o suco pancreático é produzido, principalmente, em resposta à presença de quimo nas porções superiores do intestino delgado.

O controle da secreção pancreática é feito por reguladores neuro-hormonais como a colecistocinina (endócrino), acetilcolina e peptídeos, como a secretina, polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e angiotensina II. As principais

enzimas digestivas encontradas no suco pancreático são a tripsina, quimiotripsina, carboxipolipeptidases, ribonucleases, desoxirribonucleases (enzimas proteolíticas), amilase pancreática, lipase pancreática, esterase e fosfolipases (Gardner, 1979; Nawrot-Porabka, 2015). O tripsinogênio, quimiotripsinogênio e procarboxipolipeptidases são enzimas proteolíticas que se encontram sob a forma de pró-enzimas inativas, que se tornam ativas somente depois de excretadas no intestino, pois do contrário digerem o pâncreas.

As células que secretam as enzimas proteolíticas no interior dos ácinos, também secretam os inibidores da tripsina, que previnem a ativação da tripsina, tanto no interior das células secretoras quanto nos ductos pancreáticos. Na vigência de intensa lesão do pâncreas (ou bloqueio do ducto), grandes quantidades de secreção pancreática armazenam-se nas áreas lesadas da glândula. Fisiologicamente, o pâncreas detém mecanismos capazes de prevenir a ativação intracelular do zimogênio e a sua subsequente autodigestão. Quando esse mecanismo falha, os mecanismos protetores são pouco eficientes e as secreções pancreáticas tornam-se rapidamente ativas, levando à digestão do pâncreas, originando assim a condição denominada pancreatite aguda (PA) (Elfar et al., 2007).

Em pacientes com PA, tanto as sFLA₂ de origem pancreática (grupo IB), quanto as sFLA₂ secretórias oriundas de outros tecidos (grupo IIA) encontram-se elevadas, apesar de somente a FLA₂ IIA estar associada à gravidade da doença (Schmidt, Creutzfeldt 1969; Schroder et al., 1980 apud Zhou et al., 2010). Isto indica que a atividade catalítica, assim como a patogênese local e secundária da PA (ex.: lesão pulmonar) resulta das ações da FLA₂ não pancreática, apesar do aumento sérico da FLA₂ pancreática, atuando assim como marcador da doença.

Por definição, a pancreatite é uma condição inflamatória aguda do pâncreas, que se caracteriza por aumento dessa glândula decorrente do acúmulo de secreções a inflamação do pâncreas. Devido à localização desse órgão em relação à parede abdominal, este se torna inacessível aos exames físicos e outras modalidades de avaliações clínicas diretas (Yao, Summers, 2009).

Em 1652, após realizar a necropsia de um jovem que foi a óbito com histórico de dor intensa e febre alta, o médico anatomista Nicholaes Tulp descreveu, pela primeira vez, o quadro de “inflamação do pâncreas”, onde ele observou a presença de pus e um muco viscoso (Ceranowicz et al., 2015; Pannalla, 2009). Passados mais de 300 anos, em 1992, essa mesma denominação se repetiu durante um Simpósio em Atlanta, onde essa patologia ficou definida como “uma condição inflamatória do pâncreas associado à falência desse órgão e/ou complicações locais como necrose ou formações pseudocísticas” (Bollen et al., 2008; Ceranowicz et al., 2015; Shrivastava, Bhatia, 2010).

Estima-se que, mundialmente, para cada 100 mil indivíduos, pelo menos 100 desenvolvem a inflamação aguda do pâncreas. No Brasil, a PA afeta, aproximadamente, 20 em cada 100 mil indivíduos (De Campos et al., 2008; Harper, Cheslyn-Curtis, 2010; Imrie et al., 1997; Kylanpaa et al., 2010). A forma mais grave dessa doença, a pancreatite necrosante, acomete entre 8 a 15% dos pacientes (vide revisão: Neri et al., 2013); todavia, ainda não está claro se a PA evolui para a forma necrosante. A maioria dos casos de PA (80%) evolui para a cura satisfatória e, aproximadamente, 20% dos casos resultam em óbitos. Aproximadamente 50% dos óbitos resultam dos efeitos secundários ocasionados pela PA (Frossard et al., 2008).

A etiologia da PA é limitada, mas o diagnóstico dessa doença é bem facilitado devido aos métodos de diagnóstico por imagem e exames bioquímicos disponíveis (Chang, 2006; Holstege et al., 2007). Todavia, a fisiopatologia da PA e, também, a terapia dessa doença continuam pouco estabelecida. Dentre as causas mais comuns que levam à PA estão os cálculos biliares e o abuso de álcool, dentre outras drogas (Hammer, 2014; Nilolla et al., 2014). Estas acarretam falhas nos sistemas protetores ou obstrução dos ductos biliopancreáticos, que favorecerão a liberação das enzimas digestivas na forma ativa no próprio órgão pancreático (Bhatia et al, 2004; 2005; Elfar, 2007),. O mecanismo envolvido na conversão do estado enzimático pró-ativo para o ativo não é conhecido (Shrivastava, Bhatia, 2010).

Uma vez ativas no pâncreas, as enzimas digerem as células pancreáticas provocando hemorragia, necrose, edema local e destruição completa do parênquima pancreático (Bhatia et al., 2005 a, b, c; Shrivastava,

Bhatia, 2010). O resultado é uma reação inflamatória local, que culmina na instalação do processo inflamatório característico da PA (Bhatia et al., 2005b; Saluja et al., 1999; Waldthaler et al., 2010). A duração da PA é determinante pela gravidade dessa doença (Vera-Portocarrera, Westlund, 2005).

Experimentalmente, membros do nosso grupo e de outros desenvolveram modelos de pancreatite induzidos por sFLA₂ no intuito de melhor compreender o envolvimento dessa enzima na PA. Primariamente, em 2005, Camargo e colaboradores observaram que a injeção de diferentes subtipos de FLA₂s exógenas secretórias provenientes de venenos ofídicos de *Naja mocambique mocambique* (FLA₂ *Nmm*) no ducto biliopancreático de ratos promoveu quadro semelhante ao da PA em humanos, caracterizado por extravasamento de proteínas plasmáticas e influxo de neutrófilos no pâncreas. Causou, também, efeitos secundários no pulmão desses animais, tais como influxo de neutrófilos, edema intersticial, diminuição dos espaços alveolares e necrose das células acinares. Posteriormente, Camargo e colaboradores (2006) demonstraram que a administração da mesma FLA₂ promoveu a liberação de amilase de ácinos pancreáticos isolados *in vitro* do pâncreas de ratos reforçando os achados *in vivo*.

1.2 Função sensitiva e pancreatite

Segundo a Associação Internacional de Estudo da Dor (IASP) a dor é definida como “uma experiência sensorial e emocional subjetiva desagradável associada à real ou potencial lesão tecidual ou descritas em termos de tal lesão”

Anatomicamente, as terminações nervosas sensitivas compreendem, principalmente, dois grandes grupos de fibras: tipo A (A β , A δ), formadas por corpos celulares grandes/médios e axônios mielinizados, e tipo C, que contêm corpos celulares pequenos e axônios não-mielinizados. Tais fibras inervam amplamente a pele e vísceras, incluindo o pâncreas (Li, Peng, 2014). A aplicação de determinados estímulos nessas fibras, sejam estes químicos, físicos ou biológicos resulta na liberação de neuropeptídeos, tais como as taquicininas, substância P (SP), neurocinina A (NKA) e B (NKB), o peptídeo

vasodilatador denominado peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e outros (Costa, et al., 2006; vide revisão Schaible, 2014).

O pâncreas é ricamente innervado por uma variedade de fibras mielinizadas e não mielinizadas e agregados neuronais de corpos celulares conhecidos como gânglios intra-pancreáticos. Estas estruturas ganglionares representam um componente intrínseco de inervação pancreática amplamente distribuída por todo parênquima pancreático. Estes nervos sensoriais são responsáveis, dentre outros, pela regulação do fluxo sanguíneo e, também, pela liberação de substância P (SP), CGRP (gene relacionado ao peptídeo da calcitonina) que, juntamente, agem provocando vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular (Li, Peng 2014).

A SP apresenta papel crucial no desencadeamento da resposta inflamatória neurogênica, representadas por sinais pró-inflamatórios locais, como o aumento da permeabilidade venular, extravasamento plasmático, edema e acúmulo de leucócitos e, ainda, participa da resposta dolorosa. As taquicininas atuam via receptores de membrana acoplados à proteína G, denominados receptores de taquicininas 1 (NK₁), 2 (NK₂) e 3 (NK₃). A SP é o principal agonista dos receptores NK₁, embora também atua nos receptores NK₁ e NK₂. Os receptores NK₁ estão amplamente distribuídos nas células endoteliais das vênulas pós-capilares, músculo liso, epitélio e em células inflamatórias como neutrófilos, linfócitos e macrófagos.

A SP é um neuropeptídeo com 11 aminoácidos muito bem reconhecido como um importante mediador inflamatório codificado pelo gene preprotaquicinina (PPTA). A PPTA, que age principalmente em receptores NK₁ (Koh et al., 2011), está envolvida na pancreatite aguda (Thrower et al., 2011) é altamente expressa nos neurônios sensoriais, mas também é encontrada em células como os leucócitos e células acinares pancreáticas (Koh et al., 2010, 2011), é uma das substâncias liberadas pelos neurônios aferentes primários durante o processo de instalação de pancreatite aguda onde sua ação resulta em vasodilatação local, extravasamento plasmático e dor (Liddle, Nathan, 2004), a SP tem ainda a capacidade de interagir com células endoteliais, arteríolas, mastócitos e outras células imunes (Li, Peng, 2014).

Experimentalmente, Carolan e Casale (1993) demonstraram que a aplicação da SP nas células endoteliais do pâncreas ou em células

inflamatórias, como os neutrófilos ($t_{1/2}$ 6 h) ou mastócitos, *in vitro*, contribui para a formação de edema, via receptores NK₁. Em camundongos, *in vivo*, o extravasamento plasmático das vênulas pós-capilares do pâncreas induzido pela administração exógena da SP foi bloqueado pelo antagonista seletivo do receptor NK₁ (Figini et al., 1997). Além disso, a deleção genética do receptor NK₁ em camundongos reduziu significativamente a gravidade da pancreatite experimental induzida por ceruleína (Bhatia et al., 1998). Outros estudos demonstram o envolvimento dos receptores NK₁ nas células acinares de cobaias, cuja ativação resulta na estimulação da secreção de enzimas pancreáticas (Sjodin et al., 1991). De fato, quando administrada pelo ducto pancreático, a SP estimula a liberação de secreção de amilase em células acinares, enquanto em modelo de PA induzida por ceruleína, as concentrações plasmáticas de SP encontram-se elevadas assim como a expressão de receptores NK₁ nas células acinares do pâncreas. Tanto a deleção do receptor NK₁, quanto o tratamento com os bloqueadores desse receptor previne a instalação do processo de PA experimental nesses animais em aos camundongos selvagens, confirmando assim a relevância da SP e seu receptores na pancreatite (Hedge, Bhatia, 2005).

Ademais, a SP desempenha um papel importante nas lesões pulmonares associadas a PA. As ações celulares envolvidas nos efeitos da PA relacionadas a SP envolve o aumento da geração de citocinas, quimiocinas e adesão de moléculas que, sabidamente, resultam em maior recrutamento de leucócitos do meio intravascular para o local da inflamação (Lau, Bhatia, 2006, 2007; Sun, Bhatia, 2007).

Além do envolvimento da SP na resposta inflamatória do pâncreas (pancreatite), a participação desse neuropeptídeo e o seu receptor (NK₁) foi demonstrada na nocicepção abdominal em modelo de pancreatite induzida por ceruleína (Bhatia, 2005), nos quais a expressão do receptor NK₁ mostrou-se elevada, reforçando a correlação entre a pancreatite e a SP (e seu receptor) na dor abdominal (Shrikhande et al., 2001).

A dor, assim como a inflamação do pâncreas, constitui um dos sinais importantes da pancreatite, visto ser este uma das queixas mais referidas pelos pacientes afetados por essa doença. A dor na região abdominal é reportada pelos paciente como uma sensação dolorosa irradiante e sensível ao toque,

que pode ser denominada como hiperalgesia ou alodinia (Chanana et al., 2015; Nishimura et al., 2010).

Em 1988, Bockman propôs que a dor da pancreatite pode ser resultante de um processo mecânico de ativação dos nociceptores, consequente da pressão sofrida pela formação do edema local. Estimulados, os nociceptores desencadeiam potenciais de ação suficientes para ascenderem aos centros superiores de controle da dor. Outra teoria para explicar a dor abdominal da pancreatite parte do princípio que na vigência da inflamação neurogênica, comum nessa condição, os neurônios aferentes primários, que inervam o pâncreas e liberam os neuropeptídios, capazes de agir no tecido alvo e sensibilizarem as terminações nervosas sensitivas (Hedge, Bhatia, 2005; Li, Peng, 2014).

1.3 Mecanismos de regulação das fosfolipases A_2 e pancreatite

As fosfolipases constituem um grupo de enzimas do tipo hidrolases estereolíticas, que efetuam clivagem hidrolítica de seus substratos (ex.: fosfolipídeos), podendo ser classificadas em: fosfolipases do tipo A_1 (FLA_1), A_2 (FLA_2), C (FLC) e D (FLD). As enzimas do tipo A_2 (FLA_2) ou fosfatidil-acil-hidrolases são amplamente encontradas em diversos organismos animal e vegetal, bem como em venenos de serpentes e abelhas. Em humanos, a atividade dessa enzima varia em situações patológicas, incluindo na pancreatite aguda (PA), dentre outras doenças (vide revisão: Costa et al., 2015).

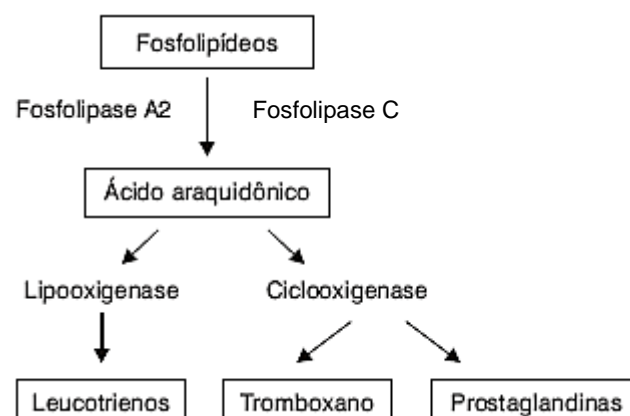
As FLAs são capazes de hidrolisar o grupo 2 acil do sn-3 fosfoglicerídeos e, assim, liberar lisofosfolipídeos e ácidos graxos, em particular, o ácido araquidônico (AA), bem conhecido precursor de um grande número de mediadores lipídicos, tais como as prostaglandinas, prostaciclina, tromboxana A_2 (TXA_2) e leucotrienos. Ademais, a ação enzimática das FLA_2 s sobre os fosfolipídeos de membrana, leva à formação de outro mediador pró-inflamatório importante, o fator de ativação plaquetária (PAF; 1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfolina; Boilard et al., 2010; Bollag, 2016).

Além das ações pró-inflamatórias importantes (Figura 1; vide revisão: Costa et al., 2015), as FLA_2 promovem outros papéis biológicos e/ou

fisiopatológicos, como a remodelação da membrana celular, degradação de fosfolípidios em micróbios e alimentos, regulação de transdução de sinalização celular, digestão e metabolismo, artrite, infarto do miocárdio, arteriosclerose, síndromes de deficiências metabólicas e digestivas associadas à obesidade, síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e diabetes tipo 2, dentre outros (Costa et al., 2015; Lee, Bae, 2016; Murakami et al., 2015). Em vista disto, as FLA₂ representam alvos farmacológicos importantes.

As FLAs podem ser divididas em extracelulares ou pancreáticas, cujo peso molecular é baixo (14-18 kDa), além de FLA₂ secretórias (sFLA₂) e intracelulares ou citosólicas (cFLA₂; alto peso molecular; 31-110 kDa), cujos mecanismos de atividade catalítica dependem ou não cálcio (Ca²⁺; Bollag, 2016). Assim, de acordo com as características funcionais, estruturais (peso molecular, sequência de aminoácidos e o número de pontes dissulfeto) e mecanismos catalíticos (ex.: His/Asp, Ser/Asp ou Ser/His/hidrolase Asp), as FLA_{2s} podem ser divididas em cinco grandes grupos, que diferem em tamanho (peso molecular – PM), a saber:

Figura 1 – Ação das FLC e FLA₂ na geração de importantes mediadores inflamatórios



Principais ações das FLA_{2s} na geração de mediadores inflamatórios. As FLA_{2s} clivam os fosfolípidios da membrana formando o ácido araquidônico que pode seguir pela via das lipooxigenases resultando na formação de leucotrienos e/ou pela via das ciclooxigenases resultando na formação de tromboxanos e prostaglandinas.

(Fonte: Modificado de Bollag, 2016)

- FLA₂ secretórias (sFLA₂; baixo PM 14-18 kDa);
- Citosólicas ou intracelulares (cFLA₂; PM intermediário 61-114 kDa);
- Cálcio independente (iFLA₂);
- PAF acetilhidrolases do fator ativador de plaquetas (PAF-AH)
- FLA₂ lisossomal

Até o presente momento foram descritos 16 subgrupos de FLA₂, nomeados de I a XVI, e classificados conforme a homologia estrutural, origem e localização. Estruturalmente os subtipos de sFLA₂ I, II, III, V, IX, X, XI, XII, XIII e XIV contêm, em comum, de seis a oito pontes dissulfeto e, no sítio ativo, a histidina, cuja atividade catalítica requer altas concentrações (mM) de Ca²⁺ (Burke, Dennis, 2009; Costa et al.; 2015). O subgrupo de proteína IV citosólica (cFLA₂ intracelulares), de peso molecular maior (IVA, IVB, IVC, IVD, IVE e IVF), incorpora uma serina no sítio catalítico, sendo estas dotadas de atividade catalítica independente de Ca²⁺; todavia, esses subgrupos necessitam de Ca²⁺ para efetuar a translocação do citosol para seu sítio de ação nos fosfolípidios de membrana (domínio C2). Todas essas enzimas possuem uma região / porção dupla catalítica Ser/Asp conservada e, também, uma molécula de arginina, essenciais para atividade catalítica.

As sFLA₂s são ainda subdivididas em famílias compostas por aproximadamente 30 isoformas, sendo que 10 destas apresentam em sua estrutura uma porção catalítica ativa (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, e XIIA), e a XIIB possui uma porção catalítica inativa (Murakami et al., 2015). Estudos sugerem, no entanto, que a ausência de uma porção catalítica ativa não está diretamente relacionada à ausência de atividade enzimática (Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização das famílias de FLA₂

Grupos de Fosfolipases do tipo A₂

Fosfolipases A ₂ citosólicas (cFLA ₂ s)	Fosfolipases A ₂ Secretórias (sFLA ₂ s)	Fosfolipases A ₂ Cálcio-dependentes (iFLA ₂ s)	FLA ₂ -PAF acetilhidrolases do fator ativador de plaquetas (PAF-AH)	FLA ₂ lisossomal
IVA, IVB, IVC, IVD, IVE, IVF	IA, IB	VIA-1, VIA-2		
	IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF	VIB, VIC, VID, VID, VIE, VIF		
	III			
	V			
	IX			
	X			
	XIA, XIB			
	XII, XIII			

Grupos e subgrupos de fosfolipases descritas até o presente momento.

No pâncreas, as células acinares são responsáveis pelo armazenamento das sFLA₂ do grupo IIB que, quando secretada na sua forma inativa diretamente no suco pancreático, torna-se ativa via ação da tripsina. Essa enzima é conhecida também como “sFLA₂s digestivas” devido a sua capacidade digestória em mamíferos. Já as sFLA₂ pertencentes ao grupo IIA podem ser sintetizadas em plaquetas, granulócitos, macrófagos e tecidos inflamados, além de participar de defesas antibacterianas (Bollag, 2016; Dennis et al., 2011; Lee, Bae, 2016). As isoformas de sFLA₂s do grupo IIA são somente detectáveis em condições patológicas na circulação, via estímulos inflamatórios provenientes de várias células. Por conseguinte, essa isoforma é também frequentemente referida como “sFLA₂ inflamatória”. Apesar desta denominação, o papel preciso dessa enzima no processo inflamatório ainda é pouco conhecido, mas sabe-se que elas são altamente expressas no pâncreas (Murakami et al., 2015).

Os venenos de serpentes compreendem uma mistura complexa de compostos bioativos, tais como proteínas, peptídeos, aminas, FLA₂s, dentre outros, cujos valores terapêuticos são sugeridos e amplamente estudados. Em particular, a grande abundância da FLA₂s nos diferentes tipos de venenos é

frequentemente correlacionada aos efeitos tóxicos do envenenamento, incluindo, neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, citotoxicidade, alterações na cascata de coagulação sanguínea e agregação plaquetária. Tais efeitos são oriundos da região com atividade catalítica, apesar de que alguns estudos mostram que a porção da enzima isenta de atividade catalítica promove efeitos semelhantes aos induzidos pela região com atividade catalítica (ver revisão: Costa et al., 2015; Vieira et al., 2013).

Ademais, estudos de cristalografia das FLA₂s extraídas do veneno de serpente revelaram alta homologia entre os subgrupos I e II que, em comum, contêm quatro hélices principais ligadas por sete pontes dissulfeto. Apesar da homologia elevada, estas diferem entre si na posição das ligações das pontes e do tamanho da cadeia C-terminal (Montecucco et al., 2008) que, por seu turno, acabam promovendo grande variedade de efeitos farmacológicos (Vieira et al., 2013). Tais efeitos são também regulados via ativação dos receptores M e N (Lambeau, Lazdunski, 1999; Murakami et al., 2015), encontrados em vários tipos celulares, incluindo as plaquetas, neutrófilos, fibroblastos, hepatócitos, cérebro, pulmão e a musculatura esquelética ou lisa (Hernandez-Oliveira et al., 2005). Em células da musculatura esquelética de humanos, as FLA₂s de veneno de serpente atuam em receptores do tipo M, causando assim ruptura da membrana plasmática e alterações na permeabilidade celular, levando à hidrólise da membrana e, assim, liberando o AA (Gutiérrez, Ownby, 2003).

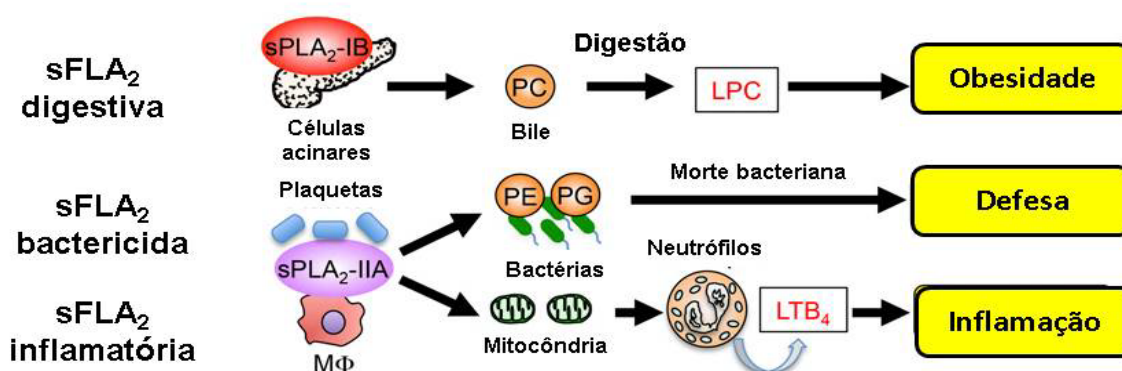
O veneno de serpente de *Crotalus durissus terrificus*, também conhecida como cascavel sul-americana, possui diversas toxinas, dentre elas a crotolina, um complexo formado por uma subunidade ácida, denominada de crotaponina, e uma subunidade básica, a FLA₂ (Landucci et al., 2004; Sampaio et al., 2010). Postula-se que a crotolina exerce efeitos protetores, tais como ações anti-inflamatória, antimicrobiana, analgésica e imunomediada. Em contraste, outros sugerem que o veneno desta serpente contém várias isoformas de FLA₂ com poucas variações na estrutura química, que promovem potente atividade neurotóxica e miotóxica (Hernandez-Oliveira et al., 2005; Sampaio et al., 2010). Essas FLA₂s de veneno de origem crotálica são do tipo extracelular e compreendem 120 a 130 resíduos de aminoácidos ligados por sete pontes dissulfeto e com atividade catalítica, caracterizada pelo resíduo D49 em seu sítio de ação. Possuem também porções inativas ou pouco ativas,

caracterizados pela presença do resíduo K49 em seu sítio ativo. Pertencem ao subgrupo sFLA₂ IIA (Hernandez-Oliveira et al., 2005).

Por seu turno, as FLA₂s extraídas do pâncreas de mamíferos (ex.: bovina) pertencem ao grupo das sFLA₂ IB, cuja expressão e atividade são abundantes no pâncreas, embora muito discreta em outras estruturas, como o pulmão e rins (Murakami et al., 2015). Assim como as FLA₂ dos venenos, as FLA₂s pertencentes aos diferentes subgrupos de mamíferos possuem alta homologia, mas as poucas diferenças acabam por desencadear respostas fisiológicas distintas no organismo (Murakami et al., 2015; Ramakrishnan et al., 2010), conforme demonstrada no esquema abaixo (Figura 2)

Uma variedade de estudos experimentais já demonstrou o papel das FLA₂s extraídas de diversos venenos ofídicos em respostas inflamatórias em modelo animal *in vivo* e *in vitro*, incluindo na pancreatite (ver revisão Costa et al., 2015), uma condição inflamatória aguda multimedida (Bhatia et al., 2005 b; c), que envolve a participação de vários mediadores endógenos, tais como o óxido nítrico (NO) (Buchwalow et al., 2013; Camargo et al., 2014), endotelina (Milnerowicz et al., 2013), fator de ativação plaquetária (PAF) (Liu, Xia; 2006), moléculas de adesão (ICAM-1) (Dabrowski et al., 2014), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), dentre outros.

Figura 2 - Diferentes respostas fisiológicas desencadeadas por diferentes sFLA₂s



Diferentes efeitos fisiológicos desencadeados por diferentes sFLA₂s. A sFLA₂ digestiva age principalmente nas células acinares culminando na produção de substâncias que resultam na obesidade. As ações fisiológicas das sFLA₂s

bactericidas e inflamatórias são mediadas pelos mastócitos e podem resultar na defesa do organismo ou na instalação do quadro inflamatório.

(Fonte: Modificado de MURAKAMI et al., 2015)

Em macrófago humano *in vitro* a FLA₂ proveniente de veneno de *Naja mocambique mocambique* estimula a geração de citocinas e quimiocinas via mecanismo dependente da via PI3K/Akt, MAPK p38, ERK1/2 culminando no aumento do NF-κB, que por sua vez, estimula a geração de mediadores inflamatórios (Granata et al., 2006) quando injetadas no peritônio de ratos, as duas subunidades de FLA₂ extraídas do veneno da *Bothrops asper*, denominadas MT-II (não catalítica) e MT-III (cataliticamente ativa), aumentaram significativamente as concentrações das citocinas IL-1 e IL-6 no fluido peritoneal desses animais (Nunnes et al., 2011).

Níveis elevados de enzimas pancreáticas, como a lipase e a amilase, são comuns e usados como marcadores no diagnóstico da pancreatite aguda (Caglayan et al., 2015; Karen et al., 2010). Tais marcados indicam apenas a presença ou ausência da pancreatite, mas não determinam o grau de gravidade da doença e, assim, são utilizados apenas como exame de diagnóstico para a doença (Mayerle, 2009).

1.4 Pancreatite e sulfeto de hidrogênio

A prática popular de banhos em águas sulfurosas termais para melhorar ou prevenir as dores e processos inflamatórios crônicos (artrite reumatóide, osteoartrite e outras inflamações articulares) tem sido empregada há muito tempo (Popovich, Gavrilishina, 1979; Sabo, 1950). Reforçando essa prática popular e os estudos clínicos, vários estudos experimentais produzidos nos últimos anos vêm confirmando um papel biológico importante para o sulfeto de hidrogênio (H₂S) na inflamação e dor (vide revisão: Zheng et al., 2015). Isto se deu, em particular, a partir da descoberta da síntese endógena do H₂S em humanos e outros mamíferos (Abe, Kimura, 1996; Griffith, 1987; Stipanuk, Beck, 1982).

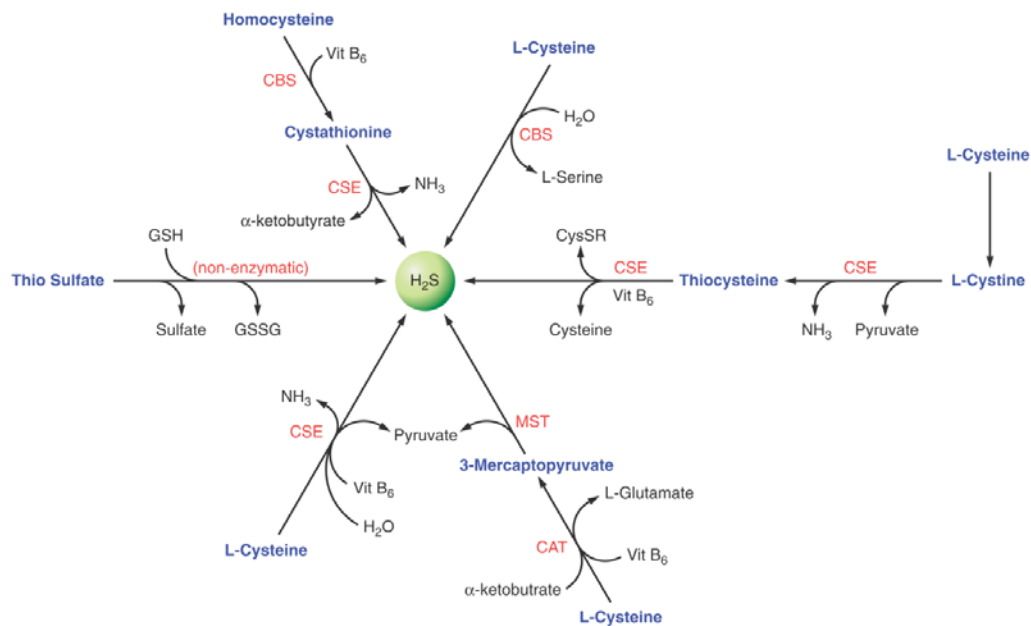
Até o presente momento, sabe-se que a síntese endógena do H₂S envolve vias enzimáticas alternativas, sendo as enzimas cistationina-γ-liase (CSE) e cistationina-γ-sintase (CBS), ambas dependentes do co-fator 5' fosfato

de pirodoxal (vitamina B6), as mais comuns (Stipanulk, Beck, 1982), que utilizam como substrato, a L-cisteína (Fiorucci et al., 2006; Wang, 2002). A obtenção da L-cisteína ocorre pela dieta alimentar ou via condensação da serina com homocisteína via reação catalisada por CBS, originando a cistationina e H₂S (Chiku et al., 2009). A CSE pode também usar prontamente a homocisteína como substrato para produzir o H₂S ou cistina (dímero de cisteína), resultando ainda na produção de piruvato, amônia e tiocisteína. A tiocisteína, via ação da CSE, pode produzir cisteína e H₂S (Figura 3; vide revisão Wang et al., 2014).

Outra via enzimática para geração de H₂S foi posteriormente proposta, que consiste numa via de ação catalisada por 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase (3MST) e cisteína aminotransferase (CAT) (Shibuya et al., 2009a,b). A CAT, idêntica ao aspartato aminotransferase (Akagi, 1982), catalisa reações de transaminação entre a L-cisteína e α -cetoglutarato, gerando a 3-mercaptopiruvato (3MP) e o L-glutamato. Por seu turno, o 3MP é usado como substrato pela 3MST, dando origem ao H₂S (Kimura, 2012; Figura 3). Outras vias não enzimáticas também participam da geração de H₂S, muito embora a concentração geradora do H₂S é mais discreta comparada àquela produzida por vias enzimáticas.

A expressão da CBS é maior no sistema nervoso central (Moore et al., 2003), mas pode ser também encontrada no rim (Roy et al., 2012), fígado (Kabil et al., 2011) e intestino (Martin et al., 2010). A CSE encontra-se amplamente expressa na periferia em estruturas como o pulmão (Fu et al., 2008), pâncreas (Nishimura et al., 2009), estômago (Fiorucci et al., 2005), fígado e rim (Ishii et al., 2004), sistema intrauterino (Patel et al., 2009) e cardiovascular (Hosoki et al., 1997; Zhao et al., 2001). Em contrapartida, a expressão da 3MST foi demonstrada no cérebro (Shibuya et al., 2009a) e aorta de ratos (Shibuya et al., 2009b).

Figura 3 – Biossíntese de H₂S em células de mamíferos



Principais vias para síntese de H₂S. L-cisteína, consiste no principal substrato para geração de H₂S a partir da via enzimática mediada pelas enzimas cistationina-γ-liase (CSE) e cistationina-γ-sintase (CBS), ambas dependentes do co-fator 5' fosfato de pirodoxal (vitamina B₆). A via CAT/3MST, recentemente descrita no processo de geração não enzimática do H₂S não parece contribuir significativamente para geração desse gás (H₂S). Fonte: Wang (2012).

Endogenamente, o H₂S pode ser metabolizado de diversas formas, como por exemplo, na mitocôndria, esse pode ser oxidado para tiosulfato, que pode ser convertido para sulfito e, posteriormente, para o sulfato por ação da sulfito oxidase (Kimura, 2012). No citosol, esse gás pode sofrer metilação pela enzima tiol-S-metiltransferase, originando o metanotiol. O H₂S pode ser também sequestrado por meta-hemoglobina, formando a sulfemoglobina (Lowicka, Beltowski, 2007). Os metabólitos do H₂S são principalmente excretados pelo rim na forma livre ou conjugados (Liu et al., 2011; Wang et al., 2014).

Devido a composição química desse gás, este pode atravessa membranas celulares sem a utilização de transportadores específicos (Szabo, 2007). Ainda, os efeitos biológicos produzidos por ele podem ser decorrentes da ação de sua forma não dissociada ou pela combinação das formas dissociada e não dissociadas (Dombkowski et al., 2004; Hughes et al., 2009). Todavia, o papel biológico desse gás fica claro quando se observa os estudos em animais nocautes de enzimas envolvidas na sua síntese ou de doadores exógenos deste. Por exemplo, animais nocautes da CBS (-/-) apresentam

retardo no crescimento e morte precoces (Maclean et al., 2010). Já os nocautes para CSE (-/-), embora não morram precocemente, desenvolvem hipertensão na idade adulta (Yang et al., 2008).

No que tange aos processos inflamatórios associados ou não à dor, inúmeros trabalhos experimentais vêm apresentando um papel promissor para agentes sintéticos doadores desse gás; muito embora, tal como o óxido nítrico, os resultados obtidos são muitas vezes conflitante do ponto de vista protetor ou deletério, que varia dependendo do modelo experimental, posologia e vias de administração desse gás.

As abordagens experimentais que investigam os mecanismos celulares e moleculares do efeito analgésico e anti-inflamatório do H₂S revelaram o envolvimento de diversos alvos, tais como, os canais iônicos, como os canais de K^{ATP} (Cunha et al., 2008; Distrutti et al., 2006; Zanardo et al., 2006), os canais de Ca²⁺ de alta condutância (BKCa) sensível ao K⁺ (Sitdikova et al., 2010) e os receptores iônicos de potencial transiente (TRPs), como o TRPA₁ (Streng et al., 2008) e o receptor de potencial transiente vanilóide 1 (TRPV₁) (Trevisani et al., 2005) parecem estar envolvidos nas ações farmacológicas dos doadores de H₂S em vários modelos experimentais.

A ativação dos canais de K^{ATP} pelo H₂S ocorre devido ao mecanismo de S-sulfidração, um processo que envolve a conversão de grupos tióis (-SH) de cisteína para persulfetos (-SSH) (Mustafa et al., 2009), uma vez que esse canal possui subunidades que formam o poro de condução para o K⁺ (Kir6.x) e subunidades do receptor de sulfoniluréia (SUR), capazes de formar pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína na porção extracelular. Por sua vez, o H₂S pode romper essas ligações, e atuar em grupos tióis livres das cisteínas, causando mudanças na conformação da subunidade SUR e, conseqüentemente, abrindo o canal de K^{ATP} (Jiang et al., 2010).

Dentre os doadores de H₂S disponíveis comercialmente, empregados em modelos inflamatórios e sensitivos, estão os doadores de H₂S de liberação espontânea/rápida: hidrossulfeto de sódio (NaHS), sulfeto de sódio (Na₂S), o reagente de Lawesson, os de liberação lenta (Benetti et al., 2013; Campos et al., 2016; Coavoy-Sánchez et al., 2016; Ekundi et al., 2010; Li et al., 2009; Rodrigues et al., 2016; Wang, 2012; Whiteman et al., 2010;) e os doadores

híbridos (H_2S associado a uma molécula anti-inflamatória não esteroide; Ekundi-Valentim et al., 2013; Gemici et al., 2015).

Postula-se que as ações tóxicas/deletérias do H_2S descritas em alguns estudos podem ser explicadas pelo fato que a taxa de liberação de H_2S dos doadores espontâneos/rápidos, como o NaHS, é extremamente alta e em curto período de tempo, enquanto a taxa de liberação de H_2S por GYY4137 é muito menor (cerca de 200 X), mas de forma constante e prolongada (Whiteman et al., 2010), mimetizando assim a liberação de H_2S endógeno em sistemas fisiológicos. Em concentrações fisiológicas, o H_2S causa relaxamento muscular por ação direta em canais de K^{ATP} , assim como intensifica a ação relaxante do óxido nítrico (Wang et al., 2014).

O H_2S circula no organismo de duas formas: cerca de 1/3 corresponde a forma da molécula gasosa e o restante circula como hidrosulfeto de sódio (Gadala, Snyder, 2010). Acredita-se haver um balanço dinâmico entre estas duas formas, que pode explicar as diferenças entre os efeitos desencadeados com baixas ou altas concentrações do H_2S . Por exemplo, em baixas concentrações, o H_2S pode ter efeito anti-inflamatório em quadros de inflamação sistêmica; mas, em altas concentrações, pode promover toxicidade celular importante, via oxidação de radicais livres (Hedge, Bhatia, 2011).

O efeito do H_2S na pancreatite é controverso, visto que na literatura encontra-se inúmeros estudos que sugerem ações anti-inflamatórias e pro-inflamatórias para o H_2S . Por exemplo, nas ações protetoras, evidências mostram que baixas concentrações do H_2S reduziram a PA e, concomitantemente, a geração de citocinas pro-inflamatórias via mecanismo regulado pela fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B (Sidhapuriwala et al., 2009; 2012a). Em contrapartida, esses mesmos autores observaram que o doador de liberação de cisteína (S-propagil-cisteína) e, portanto, um liberador lento de H_2S exerceu efeito protetor em animais com PA (Sidhapuriwala et al., 2012b). Wang e colaboradores (2013) demonstraram que o efeito protetor desse gás pode ser regulado via inativação do fator NF- κ B e a inibição da fosforilação de ERK 1/2, JNK 1/2 e p38.

Por seu turno, no time que defende o papel pró-inflamatório do H_2S , a literatura mostra que a administração de doadores de H_2S piora o quadro da PA induzida por ceruleína em camundongos, pois promove aumento na

expressão de quimiocinas, moléculas de adesão ICAM-1 e, conseqüentemente, favorece maior adesão e transmigração de neutrófilos. (Bhatia et al., 2008; Tamizhselvi 2008, 2010).

6 CONCLUSÕES

1. As FLA₂s do veneno crotálico e bovina são eficazes como ferramentas farmacológicas importantes na indução de hiperalgesia e da maioria dos sinais inflamatórios relacionados à pancreatite aguda.
2. A hiperalgesia, mas não a inflamação local e a produção de amilase e atividade de outras enzimas, parecer ser regulada por mecanismos sensitivos dependentes da ativação de fibras C e subsequente liberação de substância P, que atua em seus receptores NK₁ periféricos.
3. O pâncreas é um órgão com capacidade de geração espontânea de H₂S, sendo ambas enzimas CSE e CBS integrantes da maquinaria de síntese desse gás.

REFERENCIAS*

Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci.* 1996;16(3):1066-71.

Aho HJ, Nevalainen TJ, Lindberg RL, Aho AJ. Experimental pancreatitis in the rat. The role of phospholipase A in sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol.* 1980;15(8):1027-31.

Akagi K, Tsuji H, Kajiwara E, Murai K, Shikata T, Maki Y, Omae T. The activity of serum ribonuclease in pancreatic cancer. *Nihon S G Zasshi.* 1982;79(11):2132-6.

Balibrea JL, Rueda JC, Ortega L, Argüello JM, Torres AJ, Landa I,. Acute experimental pancreatitis in rat induced by sodium taurocholic acid: objective quantification of pancreatic necrosis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1992;420(2):117-20.

Bhatia, M, S. A., Hofbauer B, Frossard H. Role of substance P and the neurokinin 1 receptor in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95:4760–5.

Bhatia, M, Moochhala, S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol.* 2004;202(2):145-56.

Bathia, M. Inflammatory response on the pancreatic acinar cell injury. *Scandinavian J Surg.* 2005;94:97–82.

Bhatia, M, W. F., Cao Y, Lau HY, Huang J, Puneet P. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatol.* 2005a;5(2-3):132–44.

Bhatia, M, SJ, Moochhala SM, Moore PK. Hydrogen sulfide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw edema in the rat. *Br J Pharmacol.* 2005b;145:141–4.

Bhatia, M, WF, Fu D, Lau HY, Moochhala SM, Moore PK. Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury. *FASEB J.* 2005c;19:623–25.

Bhatia M, Sidhapuriwala JN, Ng SW, Tamizhselvi R, Moochhala SM. Pro-inflammatory effects of hydrogen sulphide on substance P in caerulein-induced acute pancreatitis. *J Cell Mol Med.* 2008;12(2):580-90.

Bhatia V, Ahuja V, Acharya SK, Garg PK. A randomized controlled trial of valdecoxib and glyceryl trinitrate for the prevention of post-ERCP pancreatitis. *J Clin Gastroenterol.* 2011;45(2):170-6.

Benetti LR, Campos D, Gurgueira SA, Vercesi AE, Guedes CE, Santos KL, Wallace JL, Teixeira SA, Florenzano J, Costa SK, Muscará MN, Ferreira HH.

Hydrogen sulfide inhibits oxidative stress in lungs from allergic mice in vivo. *Eur J Pharmacol.* 2013;698(1-3):463-9.

Bluth M, Lin YY, Zhang H, Viterbo D, Zenilman M. Use of gene expression profiles in cells of peripheral blood to identify new molecular markers of acute pancreatitis. *Arch Surg.* 2008;143(3):227-33

Bockman, D C, M, B, et al. Analysis of nerves in chronic pancreatitis. *Gastroenterol.* 1988;94:1459-69.

Bollag WB. Role of phospholipases in adrenal steroidogenesis. *J Endocrinol.* 2016;229:29-41

Bollen TL; Santvoor HC; Besselink MG; van Leeuwen MS; Horvath KD; Freeny PC; Gooszen HG. The Atlanta Classification of acute pancreatitis revisited. *British J Surg* 2008;95:6–21.

Borini P, Guimarães RC. Indicators of inflammation and cellular damage in chronic asymptomatic or oligosymptomatic alcoholics: correlation with alteration of bilirubin and hepatic and pancreatic enzymes. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 1999;54(2):53-60.

Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982;78(3):206-9.

Buchwalow I, Schnekenburger J, Tiemann K, Samoilova V, Bankfalvi A, Poremba C, Schleicher C, Neumann J, Boecker W. L-arginine-NO-cGMP signalling pathway in pancreatitis. *Sci Rep.* 2013;3:1899-902.

Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res.* 2009;50:S237-42

Caglayan K, Güngör B, Cinar H, Avci B, Gur S, Arslan N. Effects of oleuropein on serum inflammatory cytokines and histopathological changes in rats with pancreatitis. *Adv Clin Exp Med.* 2015;24(2):213-8

Câmara PR, Esquisatto LC, Camargo EA, Ribela MT, Toyama MH, Marangoni S, De Nucci G, Antunes E. Inflammatory oedema induced by phospholipases A₂ isolated from *Crotalus durissus* sp. in the rat dorsal skin: a role for mast cells and sensory C-fibers. *Toxicon.* 2003;41(7):823-9.

Camargo, E.A., Esquisatto, L.C., Esquisatto, M.A., Ribela, M. T., Landucci, E.C., Antunes, E. Characterization of the acute pancreatitis induced by secretory phospholipases A₂ in rats. *Toxicon.* 2005;46(8):921-26

Camargo EA, Chong HM, De La Rue RM. Highly compact asymmetric Mach-Zehnder device based on channel guides in a two-dimensional photonic crystal. *Appl Opt.* 2006;45:6507-10.

Camargo EA, Ferreira T, Ribela MT, de Nucci G, Landucci EC, Antunes E. Role of substance P and bradykinin in acute pancreatitis induced by secretory phospholipase A₂. *Pancreas*. 2008a;37(1):50-5.

Camargo EA, Delbin MA, Ferreira T, Landucci EC, Antunes E, Zanesco A. Influence of acute pancreatitis on the in vitro responsiveness of rat mesenteric and pulmonary arteries. *BMC Gastroenterol*. 2008b;29:8-19.

Camargo EA, Zanoni CI, Toyama MH, Muscara MN, Docherty RJ, Costa SK. Abdominal hyperalgesia in secretory phospholipase A₂-induced rat pancreatitis: distinct roles of NK1 receptors. *Eur J Pain*. 2011;15(9):900-6.

Camargo EA, Santana DG, Silva CI, Teixeira SA, Toyama MH, Cotrim C, Landucci EC, Antunes E, Muscara MN, Costa SK. Inhibition of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide as a therapeutic target for acute pancreatitis induced by secretory phospholipase A₂. *Eur J Pain*. 2014;18(5):691-700.

Campos D, Ravagnani FG, Gurgueira SA, Vercesi AE, Teixeira SA, Costa SK, Muscará MN, Ferreira HH. Increased glutathione levels contribute to the beneficial effects of hydrogen sulfide and inducible nitric oxide inhibition in allergic lung inflammation. *Int Immunopharmacol*. 2016;39:57-62.

Cardoso DF, Lopes-Ferreira M, Faquim-Mauro EL, Macedo MS, Farsky SH. Role of crotoxin, a phospholipase A₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. *Mediators Inflamm*. 2001;10(3):125-33.

Carolan EJ, Casale TB. Effects of neuropeptides on neutrophil migration through noncellular and endothelial barriers. *J Allergy Clin Immunol*. 1993;92(4):589-98.

Ceranowicz P, Cieszkowski J, Warzecha Z, Dembiński A. Experimental models of acute pancreatitis. *Postepy Hig Med Dosw*. 2015;69:264-9.

Ceyhan GO, Deucker S, Demir IE, Erkan M, Schmelz M, Bergmann F, Müller MW, Giese T, Büchler MW, Giese NA, Friess H. Neural fractalkine expression is closely linked to pain and pancreatic neuritis in human chronic pancreatitis. *Lab Invest*. 2009a;89(3):347-61.

Ceyhan GO, Demir IE, Rauch U, Bergmann F, Müller MW, Büchler MW, Friess H, Schäfer KH. Pancreatic neuropathy results in "neural remodeling" and altered pancreatic innervation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol*. 2009b;104(10):2555-65.

Chanana L, Jegaraj MA, Kalyaniwala K, Yadav B, Abilash K. Clinical profile of non-traumatic acute abdominal pain presenting to an adult emergency department. *J Family Med Prim Care*. 2015;4:422-5.

Chang KJ. State of the art lecture: endoscopic ultrasound (EUS) and FNA in pancreatico-biliary tumors. *Endosc.* 2006;38:S56-60.

Chen XL, Ciren SZ, Zhang H, Duan LG, Wesley AJ. Effect of 5-FU on modulation of disarrangement of immune-associated cytokines in experimental acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2009;28;15(16):2032-7.

Chiku T, Padovani D, Zhu W, Singh S, Vitvitsky V, Banerjee R. H₂S biogenesis by human cystathionine gamma-lyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem.* 2009;284:11601-12.

Coavoy-Sánchez SA, Rodrigues L, Teixeira SA, Soares AG, Torregrossa R, Wood ME, Whiteman M, Costa SK, Muscará MN. Hydrogen sulfide donors alleviate itch secondary to the activation of type-2 protease activated receptors (PAR-2) in mice. *Pharmacol Res.* 2016;113:686-94.

Costa SK, de Nucci G, Antunes E, Brain SD. Phoneutria nigriventer spider venom induces oedema in rat skin by activation of capsaicin sensitive sensory nerves. *Eur J Pharmacol.* 1997;339(2-3):223-6.

Costa SK, Esquisatto LC, Camargo E, Gambero A, Brain SD, De Nucci G, Antunes E. Comparative effect of Phoneutria nigriventer spider venom and capsaicin on the rat paw oedema. *Life Sci.* 2001;69:1573-85.

Costa SK, Brain SD, Antunes E, De Nucci G, Docherty RJ. Phoneutria nigriventer spider venom activates 5-HT₄ receptors in rat-isolated vagus nerve. *Br J Pharmacol.* 2003;139(1):59-64.

Costa SKP, Camargo EA, Antunes E. Inflammatory Action of Secretory PLA₂ from Snake Venoms [in press].

Costa SK, Starr A, Hyslop S, Gilmore D, Brain SD. How important are NK1 receptors for influencing microvascular inflammation and itch in the skin? Studies using Phoneutria nigriventer venom. *Vascul Pharmacol.* 2006;45(4):209-14.

Cunha TM, Verri WA Jr, Valério DA, Guerrero AT, Nogueira LG, Vieira SM, Souza DG, Teixeira MM, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. Role of cytokines in mediating mechanical hypernociception in a model of delayed-type hypersensitivity in mice. *Eur J Pain.* 2008;12(8):1059-68.

Dabrowski A, Osada J, Dabrowska MI, Wereszczynska-Siemiakowska U, Siemiakowski A. Increased expression of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on peripheral blood neutrophils in acute pancreatitis. *Adv Med Sci.* 2014;59(1):102-7.

De Campos T, Cerqueira C, Kuryura L, Parreira JG, Soldá S, Perlingeiro JA, Assef JC, Rasslan S. Morbimortality indicators in severe acute pancreatitis. *JOP.* 2008;3:690-7.

De Souza FR, Figuera MR, Lima TT, de Bastiani J, Barcellos IB, Almeida CE, de Oliveira MR, Bonacorso HG, Flores AE, de Mello CF. 3-Methyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-1H-1-pyrazolcarboxamide induces antinociception. *Pharmacol Biochem Behav.* 2001;68(3):525-30.

De Souza Reis FR, de Faria FC, Castro CP, de Souza PS, da Cunha Vasconcelos F, Bello RD, da Silva AJ, Costa PR, Maia RC. The therapeutic potential of a novel pterocarpanquinone LQB-118 to target inhibitor of apoptosis proteins in acute myeloid leukemia cells. *Anticancer Agents Med Chem.* 2013;13(2):341-51.

Denadai-Souza A, Camargo Lde L, Ribela MT, Keeble JE, Costa SK, Muscará MN. Participation of peripheral tachykinin NK1 receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. *Eur J Pain.* 2009;13(8):812-9.

Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev.* 2011;111(10):6130-85.

Distrutti E, Sediari L, Mencarelli A, Renga B, Orlandi S, Antonelli E, Roviezzo F, Morelli A, Cirino G, Wallace JL, Fiorucci S. Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating κ ATP channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;316(1):325-35.

Diz Filho EB, Marangoni S, Toyama DO, Fagundes FH, Oliveira SC, Fonseca FV, Calgarotto AK, Joazeiro PP, Toyama MH. Enzymatic and structural characterization of new PLA2 isoform isolated from white venom of *Crotalus durissus ruruima*. *Toxicon.* 2009;53(1):104-14.

Dombkowski RA, Russell MJ, Olson KR. Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286(4):678-85.

Ekundi-Valentim E, Santos KT, Camargo EA, Denadai-Souza A, Teixeira SA, Zanoni CI, Grant AD, Wallace J, Muscará MN, Costa SK. Differing effects of exogenous and endogenous hydrogen sulphide in carrageenan-induced knee joint synovitis in the rat. *Br J Pharmacol.* 2010;159(7):1463-74.

Ekundi-Valentim E, Mesquita FP, Santos KT, de Paula MA, Florenzano J, Zanoni CI, Rodrigues L, de Nucci G, Teixeira SA, Ferreira HH, Wallace JL, Costa SK, Muscará MN. A comparative study on the anti-inflammatory effects of single oral doses of naproxen and its hydrogen sulfide (H₂S)-releasing derivative ATB-346 in rats with carrageenan-induced synovitis. *Med Gas Res.* 2013 Nov 16;3(1):24.

Elfar M, Gaber LW, Sabek O, Fischer CP, Gaber AO. The inflammatory cascade in acute pancreatitis: relevance to clinical disease. *Surg Clin North Am.* 2007;87(6):1325-40.

Erjefält JS, Andersson P, Gustafsson B, Korsgren M, Sonmark B, Persson CG. Allergen challenge-induced extravasation of plasma in mouse airways. *Clin Exp Allergy.* 1998;28(8):1013-20.

Evans TW, Chung KF, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of platelet-activating factor on airway vascular permeability: possible mechanisms. *J Appl Physiol.* 1987;63(2):479-84.

Figini M, E. C., Grady EF, Kirkwood K, Payan DG, Ansel J, G. C., Geppetti P, and Bunnett N. Substance P and bradykinin stimulate plasma extravasation in the mouse gastrointestinal tract and pancreas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1997;272:G785-93.

Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Rizzo G, Mencarelli A, Orlandi S, Zanardo R, Renga B, Di Sante M, Morelli A, Cirino G, Wallace JL. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterol.* 2005;129(4):1210-24.

Fiorucci S, Distrutti E, Cirino G, Wallace JL. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterol.* 2006;131(1):259-71.

França, R. F; Vieira, R. P; Ferrari, E. F; Souza, R. A; Osorio, R. A. L; Prianti-Jr, A. C. G; Hyslop, S; Zamuner, S. R; Cogo, J. C; Ribeiro, W. Acute hepatotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom in rats. *J. venom. anim. toxins incl. trop. dis.* 2009;15(1):61-78.

Frossard JL, Steer ML, Pastor CM. Acute pancreatitis. *Lancet.* 2008;12;371(9607):143-52.

Fu Z, Liu X, Geng B, Fang L, Tang C. Hydrogen sulfide protects rat lung from ischemia-reperfusion injury. *Life Sci.* 2008;82(23-24):1196-202.

Gadalla MM, Snyder SH. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *J Neurochem.* 2010;113(1):14-26.

Gardner JD, Costenbader CL, Uhlemann ER. Effect of extracellular calcium on amylase release from dispersed pancreatic acini. *Am J Physiol.* 1979;236(6):E754-62.

Giorgi R, Bernardi MM, Cury Y. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon.* 1993; 31(10):1257-65.

Granata F, Frattini A, Loffredo S, Del Prete A, Sozzani S, Marone G, Triggiani M. Signaling events involved in cytokine and chemokine production induced by

secretory phospholipase A2 in human lung macrophages. *Eur J Immunol.* 2006;36(7):1938-50.

Griffith OW, Campbell EB. Resolution of cysteine and methionine enantiomers. *Methods Enzymol.* 1987;143:166-72.

Gutiérrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon.* 2003;15:915-31.

Hammer HF. An update on pancreatic pathophysiology (do we have to rewrite pancreatic pathophysiology?). *Wien Med Wochenschr.* 2014;164(3-4):57-62.

Harper SJ, Cheslyn-Curtis S. Acute pancreatitis. *Ann Clin Biochem.* 2010;48:23-37.

Hegde A, Bhatia M. Neurogenic inflammation in acute pancreatitis. *JOP.* 2005;6(5):417-21.

Hegde A, Bhatia M. Hydrogen sulfide in inflammation: friend or foe? *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2011;10(2):118-22.

Hernandez-Oliveira S, Toyama MH, Toyama DO, Marangoni S, Hyslop S, Rodrigues-Simioni L. Biochemical, pharmacological and structural characterization of a new PLA2 from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom. *Protein J.* 2005;24(4):233-42.

Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;237(3):527-31.

Holstege A, Zolinski P, Woidy L, Permanetter W. The patient with unexplained elevated serum liver enzymes. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2007;21(3):535-50.

Hucl T, Kylanpää ML, Künzli B, Witt H, Lempinen M, Schneider A, Kemppainen E, Löhr M, Haas SL, Friess H, Ockenga J, Rosendahl J, Schulz HU, Gress T, Singer MV, Pfützer RH. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism in patients with acute and chronic pancreatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2009;20:645-59

Imrie, C. W. (1997). "Acute pancreatitis: overview." *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1997;9:103-5.

Ishii I, Akahoshi N, Yu XN, Kobayashi Y, Namekata K, Komaki G, Kimura H. Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *Biochem J.* 2004;381:113-23.

Ishikura H, Nishimura S, Matsunami M, Tsujiuchi T, Ishiki T, Sekiguchi F, Naruse M, Nakatani T, Kamanaka Y, Kawabata A. The proteinase inhibitor camostat mesilate suppresses pancreatic pain in rodents. *Life Sci.* 2007;1;80(21):1999-04.

Jiang B, Tang G, Cao K, Wu L, Wang R. Molecular mechanism for H₂S-induced activation of K(ATP) channels. *Antioxid Redox Signal.* 2010;12(10):1167-78.

Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 2001;413(6852):203-10.

Karen M, Yuksel O, Akyürek N, Ofluoğlu E, Çağlar K, Sahin TT, Paşaoğlu H, Memiş L, Akyürek N, Bostanci H. Probiotic agent *Saccharomyces boulardii* reduces the incidence of lung injury in acute necrotizing pancreatitis induced rats. *J Surg Res.* 2010;160(1):139-44.

Kabil O, Weeks CL, Carballal S, Gherasim C, Alvarez B, Spiro TG, Banerjee R. Reversible heme-dependent regulation of human cystathionine β -synthase by a flavoprotein oxidoreductase. *Biochem.* 2011;50(39):8261-3.

Karray A, Zarai Z, Gargouri Y, Verger R, Bezzine S. Kinetic properties of pancreatic and intestinal sPLA₂ from chicken and mammals using the monomolecular film technique. *J Colloid Interface Sci.* 2011;15;363(2):620-5.

Kawabata A, Matsunami M, Tsutsumi M, Ishiki T, Fukushima O, Sekiguchi F, Kawao N, Minami T, Kanke T, Saito N. Suppression of pancreatitis-related allodynia/hyperalgesia by proteinase-activated receptor-2 in mice. *Br J Pharmacol.* 2006;148(1):54-60.

Keck T, Marjanovic G, Fernandez-del Castillo C, Makowiec F, Schäfer AO, Rodriguez JR, Razo O, Hopt UT, Warshaw AL. The inflammatory pancreatic head mass: significant differences in the anatomic pathology of German and American patients with chronic pancreatitis determine very different surgical strategies. *Ann Surg.* 2009;249(1):105-10.

Kimura H. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. *Nitric Oxide.* 2014;41:4-10.

Koh G, Lee DH, Woo JT. 2-Deoxy-D-ribose induces cellular damage by increasing oxidative stress and protein glycation in a pancreatic beta-cell line. *Metabolism.* 2010;59(3):325-32.

Koh YH, Tamizhselvi R, Mochhala S, Bian JS, Bhatia M. Role of protein kinase C in caerulein induced expression of substance P and neurokinin-1-receptors in murine pancreatic acinar cells. *J Cell Mol Med.* 2011;15(10):2139-49.

Konno K, Picolo G, Gutierrez VP, Brigatte P, Zambelli VO, Camargo AC, Cury Y. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Peptides.* 2008;29(8):1293-304.

Korobowicz E, Celiński K, Madro A, Prozorow-Król B, Korolczuk A, Cichoz-Lach H, Słomka M. Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma(PPARgamma)-specific agonist, as a modulator in experimental acute pancreatitis. *Med Sci Monit.* 2009;15(1):21-9.

Łowicka E, Beltowski J. Hydrogen sulfide (H₂S) - the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol Rep.* 2007;59(1):4-24.

Kylänpää ML, Repo H, Puolakkainen PA. Inflammation and immunosuppression in severe acute Pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2010;16(23):2867-72.

Kuner R. Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med.* 2010;14:192-03.

Lau HY, Bhatia M. The effect of CP96,345 on the expression of tachykinins and neurokinin receptors in acute pancreatitis. *J Pathol.* 2006;208(3):364-71.

Lau HY, Bhatia M. Effect of CP-96,345 on the expression of adhesion molecules in acute pancreatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292(5):G1283-92.

Landucci EC, Toyama M, Marangoni S, Oliveira B, Cirino G, Antunes E, de Nucci G. Effect of crotafotin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A₂. *Toxicon.* 2000;38(2):199-08.

Landucci EC, Gambero A, Thomazzi SM, Cintra AC, De Nucci G, Antunes E. Signalling pathways regulating human neutrophil migration induced by secretory phospholipases A₂. *Toxicon.* 2004;44(5):473-81.

Lee G, Bae H. Bee Venom Phospholipase A₂: Yesterday's Enemy Becomes Today's Friend. *Toxins (Basel).* 2016;8(2):48.

Leung PS, Chan WP, Nobiling R. Regulated expression of pancreatic renin-angiotensin system in experimental pancreatitis. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;30;166(2):121-8.

Leung, P. S, and M. C. Chappell. Tissue renin angiotensin system: its expression, localization, regulation and potential role in the pancreas. *J Mol Endocrinol.* 2001;26:155-64.

Leung, P. S. Intrinsic angiotensin-generating system: its tissue specific functions and clinical implications. *Panminerva. Med.* 2002;44:93-7.

Leung, P. S. Pancreatic renin-angiotensin system: a novel target for the potential treatment of pancreatic disease. *J Pancreas.* 2003;4:89-1.

Leung PS, Ip SP. Pancreatic acinar cell: its role in acute pancreatitis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(7):1024-30.

- Li Q, Peng J. Sensory nerves and pancreatitis. *Gland Surg.* 2014;3(4):284-92.
- Li W, Jin HF, Liu D, Sun JH, Jian PJ, Li XH, Tang CS, DU JB. Hydrogen sulfide induces apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cell in rats with pulmonary hypertension induced by high pulmonary blood flow. *Chin Med J Engl.* 2009;122(24):3032-8.
- Liu YH, Yan CD, Bian JS. Hydrogen sulfide: a novel signaling molecule in the vascular system. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011;58(6):560-9.
- Liu LR, Xia SH. Role of platelet-activating factor in the pathogenesis of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2016; 28;12(4):539-45
- Liddle RA, Nathan JD. Neurogenic inflammation and pancreatitis. *Pancreatol.* 2004;4(6):551-9
- Lloret S, Moreno JJ. Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A₂ purified from porcine pancreas and snake venoms. *Toxicon.* 1993; 31(8):949-56.
- Lukens JR, Gross JM, Kanneganti TD. IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease. *Front Immunol.* 2012;9:315-9.
- Macleaun KN, Sikora J, Kožich V, Jiang H, Greiner LS, Kraus E, Krijt J, Crnic LS, Allen RH, Stabler SP, Elleder M, Kraus JP. Cystathionine beta-synthase null homocystinuric mice fail to exhibit altered hemostasis or lowering of plasma homocysteine in response to betaine treatment. *Mol Genet Metab.* 2010;101(2-3):163-71.
- Malleo G, Mazzon E, Genovese T, Di Paola R, Muià C, Centorrino T, Siriwardena AK, Cuzzocrea S. Etanercept attenuates the development of cerulein-induced acute pancreatitis in mice: a comparison with TNF-alpha genetic deletion. *Shock.* 2007;27(5):542-51.
- Martin GR, McKnight GW, Dickey MS, Coffin CS, Ferraz JG, Wallace JL. Hydrogen sulphide synthesis in the rat and mouse gastrointestinal tract. *Dig Liver Dis.* 2010;42(2):103-9.
- Mayerle J. A novel role for leucocytes in determining the severity of acute pancreatitis. *Gut.* 2009;58(11):1440-1.
- Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol.* 1999;57(1):1-164.
- Milnerowicz S, Milnerowicz H, Nabzdyk S, Jabłonowska M, Grabowski K, Taboła R. Plasma endothelin-1 levels in pancreatic inflammations. *Adv Clin Exp Med.* 2013;22(3):361-8.

Mincis M, Mincis R. When should liver transplant be indicated in the treatment of alcoholic hepatic disease?. *Rev Assoc Med Bras.* 1996;42(4):242-4.

Moore,PK, B. M., Mochhala S. Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future? *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:609-11.

Morioka N, Takeda K, Kumagai K, Hanada T, Ikoma K, Hide I, Inoue A, Nakata Y. Interleukin-1 β -induced substance P release from rat cultured primary afferent neurons driven by two phospholipase A2 enzymes: secretory type IIA and cytosolic type IV. *J Neurochem.* 2002;80(6):989-97.

Murakami M, Sato H, Miki Y, Yamamoto K, Taketomi Y. A new era of secreted phospholipase A₂. *J Lipid Res.* 2015;56(7):1248-61.

Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, Barrow RK, Yang G, Wang R, Snyder SH. H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Sci Signal.* 2009;10;2(96):72-9.

Nawrot-Porąbka K, Jaworek J, Leja-Szpak A, Kot M, Lange S. The role of antisecretory factor in pancreatic exocrine secretion: studies in vivo and in vitro. *Exp Physiol.* 2015;100(3):267-77.

Neri V, Ambrosi A, Fersini A, Tartaglia N, Lapolla F, Forlano I. Severe acute pancreatitis: clinical forms of different gravity. *Ann Ital Chir.* 2013;84(1):47-53.

Nikkola J, Rinta-Kiikka I, Rätty S, Laukkarinen J, Lappalainen-Lehto R, Järvinen S, Seppänen H, Nordback I, Sand J. Pancreatic morphological changes in long-term follow-up after initial episode of acute alcoholic pancreatitis. *J Gastrointest Surg.* 2014;18(1):164-70

Nishimura S, Fukushima O, Ishikura H, Takahashi T, Matsunami M, Tsujiuchi T, Sekiguchi F, Naruse M, Kamanaka Y, Kawabata A. Hydrogen sulfide as a novel mediator for pancreatic pain in rodents. *Gut.* 2009;58(6):762-70.

Nishimura S, Fukushima O, Matsunami M, Aoki Y, Nishikawa H, Ishikura H, Kawabata A. Phosphorylation of ERK in the spinal dorsal horn following pancreatic pronociceptive stimuli with proteinase-activated receptor-2 agonists and hydrogen sulfide in rats: evidence for involvement of distinct mechanisms. *J Neurosci Res.* 2010;88(14):3198-205.

Nogueira-Neto Fde S, Amorim RL, Brigatte P, Picolo G, Ferreira WA Jr, Gutierrez VP, Conceição IM, Della-Casa MS, Takahira RK, Nicoletti JL, Cury Y. The analgesic effect of crotoxin on neuropathic pain is mediated by central muscarinic receptors and 5-lipoxygenase-derived mediators. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008;91(2):252-60.

Nunes FP, Sampaio SC, Santoro ML, Sousa-e-Silva MC. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. *Toxicon.* 2007;15;49(8):1090-8.

Nunes DC, Rodrigues RS, Lucena MN, Cologna CT, Oliveira AC, Hamaguchi A, Homs-Brandeburgo MI, Arantes EC, Teixeira DN, Ueira-Vieira C, Rodrigues VM. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A₂ from Bothrops leucurus snake venom. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2011;154(3):226-33.

Oruc N, Papachristou GI, Avula H, Slivka A, Lamb J, Whitcomb DC. Angiotensin-converting enzyme gene DD genotype neither increases susceptibility to acute pancreatitis nor influences disease severity. *HPB* 2009;11(1):45-9.

Pannala R, Kidd M, Modlin IM. Acute pancreatitis: a historical perspective. *Pancreas*. 2009;38(4):355-66.

Patel P, Vatish M, Heptinstall J, Wang R, Carson RJ. The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:10-4.

Pereañez JA, Núñez V, Huanchuire-Vega S, Marangoni S, Ponce-Soto LA. Biochemical and biological characterization of a PLA₂ from crotoxin complex of *Crotalus durissus cumanensis*. *Toxicon*. 2009;53(5):534-42.

Pérez S, Pereda J, Sabater L, Sastre J. Redox signaling in acute pancreatitis. *Redox Biol*. 2015;5:1-14.

Pratt JC, Sawasdikosol S, van den Brink MR, Burakoff SJ. Positive and negative signaling pathways. *Transplant Proc*. 1999;31(1-2):772-4.

Piccolo G, Giorgi R, Cury Y. delta-opioid receptors and nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. *Eur J Pharmacol*. 2000;391(1-2):55-62.

Popovich Ala, Gavrilishina GE. [Use of hydrogen sulfide baths from Konopkivka spring in the overall treatment of hypertension]. *Vrach Delo*. 1979;(11):36-7.

Rangel-Santos A, Dos-Santos EC, Lopes-Ferreira M, Lima C, Cardoso DF, Mota I. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Toxicon*. 2004;43(7):801-10.

Ramakrishnan C, Subramanian V, Velmurugan D. Molecular dynamics study of secretory phospholipase A₂ of Russell's viper and bovine pancreatic sources. *J Phys Chem B*. 2010;114(42):13463-72.

Rodrigues L, Ekundi-Valentim E, Florenzano J, Cerqueira AR, Schmidt TP, Santos KT, Soares AG, Teixeira SA, Ribela MT, De Nucci G, Wood M, Whiteman M, Muscará MN, Costa SK. Protective effects of exogenous and

endogenous hydrogen sulfide in mast cell-mediated pruritus and cutaneous acute inflammation in mice. *Pharmacol Res.* 2016;10:30529-1.

Roy A, Khan AH, Islam MT, Prieto MC, Majid DS. Interdependency of cystathione- γ -lyase and cystathione β -synthase in hydrogen sulfide-induced blood pressure regulation in rats. *Am J Hypertens.* 2012;25(1):74-81.

Sabo GP. Hydrogen sulfide carbon dioxide mud baths as a new balneologic factor. *Sov Med.* 1950;9:26-7.

Sampaio SC, Sousa-e-Silva MC, Borelli P, Curi R, Cury Y. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. *J Leukoc Biol.* 2001;70(4):551-8.

Sampaio SC, Brigatte P, Sousa-e-Silva MC, dos-Santos EC, Rangel-Santos AC, Curi R, Cury Y. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. *Toxicon.* 2003;41(7):899-07.

Sampaio SC, Rangel-Santos AC, Peres CM, Curi R, Cury Y. Inhibitory effect of phospholipase A₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. *Toxicon.* 2005;45(5):671-6.

Sampaio SC, Hyslop S, Fontes MR, Prado-Franceschi J, Zambelli VO, Magro AJ, Brigatte P, Gutierrez VP, Cury Y. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. *Toxicon.* 2010;55(6):1045-60.

Sarles H. Alcohol and the pancreas. *Nutr Metab.* 1977;21(1-3):175-85.

Schaible HG. Nociceptive neurons detect cytokines in arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(5):470-81.

Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *J Biochem.* 2009a;146(5):623-6.

Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, Ogasawara Y, Togawa T, Ishii K, Kimura H. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxid Redox Signal.* 2009b;11(4):703-14.

Schmidt H, Creutzfeldt W. The possible role of phospholipase A in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol.* 1969;4(1):39-48.

Schröder T, Kivilaakso E, Kinnunen PK, Lempinen M. Serum phospholipase A₂ in human acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol.* 1980;15(5):633-6.

Sidhapuriwala JN, Ng SW, Bhatia M. Effects of hydrogen sulfide on inflammation in caerulein-induced acute pancreatitis. *J Inflamm.* 2009; 30;6:35.

Sidhapuriwala JN, Hegde A, Ang AD, Zhu YZ, Bhatia M. Effects of S-propargyl-cysteine (SPRC) in caerulein-induced acute pancreatitis in mice. *PLoS One*. 2012a;7(3):e32574.

Shrikhande SV, F. H., di Mola FF, Tempia-Caliera A, Conejo G. Jr, Zhu Z, Zimmermann A, Buchler M. W. NK-1 receptor gene expression is related to pain in chronic pancreatitis. *Pain*. 2001;91:209–17.

Shrivastava P; Bhatia M. Essential role of monocytes and macrophages in the progression of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2010;16(32):3995-02.

Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta*. 2000;31;1488(1-2):1-19.

Sjodin,L, D. H., Gylfe E. Calcium oscillations in guinea-pig pancreatic acinar cells exposed to carbachol, cholecystokinin and substance P. *J Physiol*. 1991;444:763–76.

Sitdikova GF, Weiger TM, Hermann A. Hydrogen sulfide increases calcium-activated potassium (BK) channel activity of rat pituitary tumor cells. *Pflugers Arch*. 2010;459(3):389-97.

Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydratation in liver and kidney of the rat. *Biochem J*. 1982;15;206(2):267-77.

Streng TK, Talo A, Andersson KE, Santti R. A dose-dependent dual effect of oestrogen on voiding in the male mouse? *BJU Int*. 2005;96(7):1126-30.

Sun J, Bhatia M. Blockade of neurokinin-1 receptor attenuates CC and CXC chemokine production in experimental acute pancreatitis and associated lung injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292(1):G143-53.

Suzuki M, Okahisa T, Sogabe M, Iwaki H, Okita Y, Kinetics of Group IB and IIA Phospholipase A₂ During Low-Volume Continuous Hemodiafiltration in Severe Acute Pancreatitis *Artif Organs*, 2007;31:5-11.

Szabó C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*.2007;6(11):917-35.

Tamizhselvi R, Moore PK, Bhatia M. Inhibition of hydrogen sulfide synthesis attenuates chemokine production and protects mice against acute pancreatitis and associated lung injury. *Pancreas*. 2008;36(4):e24-31.

Tamizhselvi R, Koh YH, Sun J, Zhang H, Bhatia M. Hydrogen sulfide induces ICAM-1 expression and neutrophil adhesion to caerulein-treated pancreatic

acinar cells through NF-kappaB and Src-family kinases pathway. *Exp Cell Res.* 2010;316(9):1625-36.

Tavares de Lima W, Kwasniewski FH, Sirois P, Jancar S. Studies on the mechanism of PAF-induced vasopermeability in rat lungs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1995;52(4):245-9.

Teles AM, Kumagai Y, Brain SD, Teixeira SA, Varriano AA, Barreto MA, de Lima WT, Antunes E, Muscará MN, Costa SK. Involvement of sensory nerves and TRPV1 receptors in the rat airway inflammatory response to two environment pollutants: diesel exhaust particles (DEP) and 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ). *Arch Toxicol.* 2010;84(2):109-17

Toyama MH, Toyama DO, Joazeiro PP, Carneiro EM, Beriam LO, Marangoni LS, Boschero AC. Biological and structural characterization of a new PLA2 from the *Crotalus durissus collilineatus* venom. *Protein J.* 2005;24(2):103-12.

Trevisani M, Patacchini R, Nicoletti P, Gatti R, Gazzieri D, Lissi N, Zagli G, Creminon C, Geppetti P, Harrison S. Hydrogen sulfide causes vanilloid receptor 1-mediated neurogenic inflammation in the airways. *Br J Pharmacol.* 2005;145(8):1123-31.

Turkyilmaz S, Alhan E, Ercin C, Vanizor BK. Effects of enalaprilat on acute necrotizing pancreatitis in rats. *Inflammation.* 2007;30(6):205-12.

Uhl W, Müller CA, Büchler MW. [Therapy of acute pancreatitis]. *Ther Umsch.* 1997;54(11):645-8.

Vera-Portocarrero, L. P., Lu, Y. Nociception in persistent pancreatitis in rats: effects of morphine and neuropeptide alterations. *Anesthesiology.* 2004;98:474-84.

Vera-Portocarrero, L., Westlund, K. N. Role of Neurogenic Inflammation in Pancreatitis and Pancreatic Pain. *Neurosign.* 2005;14:158-65.

Vieira LF, Magro AJ, Fernandes CA, de Souza BM, Cavalcante WL, Palma MS, Rosa JC, Fuly AL, Fontes MR, Gallacci M, Butzke DS, Calderon LA, Stábeli RG, Giglio JR, Soares AM. Biochemical, functional, structural and phylogenetic studies on Intercro, a new isoform phospholipase A2 from *Crotalus durissus terrificus* snake venom. *Biochimie.* 2013;95(12):2365-75.

Wang YW, Gao YH, Yao XJ, Liu MC, Hu ZD, Fan BT. Studies on quantitative structure-retention relationships for sulfides on stationary phases of different polarities. *Se Pu.* 2002;20(5):415-8.

Wang Y, Qu R, Hu S, Xiao Y, Jiang X, Xu GY. Upregulation of cystathionine β -synthetase expression contributes to visceral hyperalgesia induced by heterotypic intermittent stress in rats. *PLoS One.* 2012;7(12):531-65.

Wang G, Han B, Zhou H, Wu L, Wang Y, Jia G, Lv J, Cheng Z, Pan S, Liu J, Zhou Y, Sun B. Inhibition of hydrogen sulfide synthesis provides protection for severe acute pancreatitis rats via apoptosis pathway. *Apoptosis*. 2013;18(1):28-42.

Wang G, Lv JC, Wu LF, Li L, Dong DL, Sun B. From nitric oxide to hyperbaric oxygen: invisible and subtle but nonnegligible gaseous signaling molecules in acute pancreatitis. *Pancreas*. 2014;43(4):511-7.

Waldthaler A, Schütte K, Malfertheiner P. Causes and mechanisms in acute pancreatitis. *Dig Dis*. 2010;28(2):364-72.

Whiteman M, Haigh R, Tarr JM, Gooding KM, Shore AC, Winyard PG. Detection of hydrogen sulfide in plasma and knee-joint synovial fluid from rheumatoid arthritis patients: relation to clinical and laboratory measures of inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1203:146-50.

Whiteman M, Winyard PG. Hydrogen sulfide and inflammation: the good, the bad, the ugly and the promising. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2011;4(1):13-32.

Woodcock J. Comparative effectiveness research and the regulation of drugs, biologics and devices. *J Comp Eff Res*. 2013;2(2):95-7.

Yang Z, Liang G, Xu B. Enzymatic hydrogelation of small molecules. *Acc Chem Res*. 2008;41(2):315-26.

Yao J, Summers RM. Statistical location model for abdominal organ localization. *Med Image Comput Comput Assist Interv*. 2009;12:9-17.

Yubero S, Ramudo L, Manso MA, De Dios I. Mechanisms of dexamethasone-mediated chemokine down-regulation in mild and severe acute pancreatitis. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792(12):1205-11.

Zambelli VO, Sampaio SC, Sudo-Hayashi LS, Greco K, Britto LR, Alves AS, Zychar BC, Gonçalves LR, Spadacci-Morena DD, Otton R, Della-Casa MS, Curi R, Cury Y. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxygenase-derived mediators. *Toxicon*. 2008;51(8):1357-67.

Zanardo RC, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB J*. 2006;20(12):2118-20.

Zanchet EM, Cury Y. Peripheral tachykinin and excitatory amino acid receptors mediate hyperalgesia induced by *Phoneutria nigriventer* venom. *Eur J Pharmacol*. 2003;467(1-3):111-8.

Zanchet EM, Longo I, Cury Y. Involvement of spinal neurokinins, excitatory amino acids, proinflammatory cytokines, nitric oxide and prostanoids in pain

facilitation induced by Phoneutria nigriventer spider venom. Brain Res. 2004;1021(1):101-11.

Zhang XP, Zhang J, Ma ML, Cai Y, Xu RJ, Xie Q, Jiang XG, Ye Q. Pathological changes at early stage of multiple organ injury in a rat model of severe acute pancreatitis. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2010;9(1):83-7.

Zhang J, Sio SW, Mochhala S, Bhatia M. Role of hydrogen sulfide in severe burn injury-induced inflammation in mice. Mol Med. 2010;16(9-10):417-24.

Zhao M, Brunk UT, Eaton JW. Delayed oxidant-induced cell death involves activation of phospholipase A2. FEBS Lett. 2001;509(3):399-04.

Zhao,W, Wang R. H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002;283:H474-80.

Zhao JB, Liao DH, Nissen TD. Animal models of pancreatitis: can it be translated to human pain study? World J Gastroenterol. 2013;19(42):7222-30.

Zheng Y, Ji X, Ji K, Wang B. Hydrogen sulfide prodrugs-a review. Acta Pharm Sin B. 2015;5:367-77.

Zhou MT, Chen CS, Chen BC, Zhang QY, Andersson R. Acute lung injury and ARDS in acute pancreatitis: mechanisms and potential intervention. World J Gastroenterol. 2010;16(17):2094-9.