UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

DÉBORA MARIA GOMES CUNHA

**Expressão de Peptídeos Antimicrobianos na mucosa intestinal de
ratos idosos submetidos ao modelo de Pancreatite Aguda**

São Paulo
2014

DÉBORA MARIA GOMES CUNHA

**Expressão de Peptídeos Antimicrobianos na mucosa intestinal de
ratos idosos submetidos ao modelo de Pancreatite Aguda**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Processos Imunes e
Infecciosos
Orientador: Dr. Fabiano Pinheiro da Silva

São Paulo

2014

Esta dissertação de mestrado está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journal Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação e dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Cordeiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3. ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2012.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cunha, Débora Maria Gomes

Expressão de peptídeos antimicrobianos na mucosa intestinal de ratos idosos submetidos ao modelo de pancreatite aguda / Débora Maria Gomes Cunha. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Imunes e Infeciosos.

Orientador: Fabiano Pinheiro da Silva.

Cunha, DMG. *Expressão de Peptídeos Antimicrobianos na mucosa intestinal de ratos idosos submetidos ao modelo de Pancreatite Aguda*. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: __/__/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À minha querida mãe e aos meus familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, que me deu o dom da vida e que me concede inúmeras graças e oportunidades a cada dia, inclusive a de ter cursado e concluído este mestrado nesta faculdade tão renomada.

Agradeço também à minha querida mãe, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos da minha vida, e à minha avó, Concita Gomes (em memória), que, onde quer que esteja, certamente, intercede por mim a cada dia. Sei que a elas, minhas duas mães, devo toda gratidão do mundo por tudo que sou. Agradeço principalmente por terem me incentivado a estudar e concluir tudo o que me propus, e me proponho, fazer.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Fabiano Pinheiro da Silva, pela oportunidade concedida, pelos elogios, conselhos, paciência e compreensão, que sempre teve comigo, com o intuito de me tornar uma pessoa e uma pesquisadora melhor.

Não poderia deixar de agradecer à Dra. Marcia Koike, à Dra. Denise Barbeiro, ao Dr. Hermes Barbeiro e ao Professor Dr. Marcel Cerqueira Cesar Machado, que foram cruciais para o desenvolvimento desta pesquisa, ao me ensinarem com paciência e dedicação. Aproveito para agradecer também a todos os colegas do LIM 51 pelo companheirismo, em especial ao Mike, ao Guilherme e à Rízia, que me deram opiniões valiosíssimas e me ajudaram nos experimentos.

Agradeço a toda minha família, que está em São Luís, aos meus tios Antônio e Manuel, que sempre foram como pais para mim e me apoiaram desde quando vim

para São Paulo. Às minhas tias Therezinha, Maria do Carmo, Neusa, Helena, Conceição e Fátima, também pelo apoio e incentivo. Ao meu tio José Raimundo, por torcer sempre por mim, mesmo estando distante. Aos meus primos e primas, pois, graças a Deus, somos uma família unida, e sei que todos sempre torceram pelo meu sucesso profissional aqui em São Paulo. Ao meu pai, que, mesmo distante, certamente sempre desejou o meu progresso.

Agradeço em especial à minha amiga e companheira Andreza, por estar ao meu lado em todos os momentos, pelos conselhos, por me ouvir, pela companhia e lealdade, sempre me encorajando e me incentivando a ser uma pessoa melhor.

Agradeço a amizade e o companheirismo de Marquinhos, Dante, Viviane e Andressa Marques, por serem conselheiros incansáveis e por toda força que me deram até o momento. Também não poderia me esquecer de agradecer à minha terapeuta Patrícia Alves, que foi fundamental em todo o período do mestrado, nos momentos de desânimo e tristeza, mas também naqueles de empolgação e determinação para concluir esta etapa.

Meus agradecimentos à Faculdade de Medicina da USP, por ter me acolhido durante todo este tempo e por ter me dado a oportunidade de contar com a ajuda de excelentes profissionais, os quais auxiliaram a minha formação acadêmica. O meu muito obrigada também à CAPES, pelo financiamento deste trabalho.

Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.

Chico Xavier

RESUMO

Cunha, DMG. Expressão de Peptídeos Antimicrobianos na mucosa intestinal de ratos idosos submetidos ao modelo de Pancreatite Aguda [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2014. 81 f.

Peptídeos antimicrobianos, também chamados na literatura médica de AMPs (*Antimicrobial Peptides*), são agrupamentos de 12 a 50 aminoácidos que têm funções antimicrobianas e imunorregulatórias. Os AMPs são produzidos principalmente nos epitélios, destacando-se o epitélio intestinal, onde participam da homeostase da barreira intestinal. A Pancreatite Aguda (PA) é uma doença com altas taxas de mortalidade e morbidade, na qual frequentemente ocorre translocação de bactérias e endotoxinas para o epitélio intestinal e para a corrente sanguínea. A translocação bacteriana ocorre, principalmente, devido à falência da barreira intestinal. Em idosos, a PA tende a ser uma doença mais grave, porém os mecanismos que justificam essa maior gravidade ainda não são bem compreendidos. O objetivo deste trabalho é fazer um estudo da expressão gênica dos peptídeos antimicrobianos α -defensina 5 e 7 e da catelicidina CRAMP em ratos jovens e idosos submetidos a um modelo de Pancreatite Aguda. Ratos jovens e idosos foram submetidos à PA utilizando-se Ácido Taurocólico 2,5% e, após doze horas, foram sacrificados. Foi coletado 1cm do íleo terminal para realização de RT-PCR para os genes das α -defensinas 5 e 7 e da catelicidina CRAMP. Adicionalmente, foram quantificados os níveis de mRNA das citocinas TNF- α e IL-10. Através da técnica de Milliplex, foram dosadas no soro as citocinas IFN- γ , IP-10, IL-10, IL-6, IL-18, TNF- α , IL-1 β e Leptina. Como resultado, detectou-se maior expressão gênica das α -defensinas 5 e 7 no grupo de animais idosos, na vigência de insulto pancreático, quando comparado a animais jovens na mesma condição. Com relação à CRAMP, não houve diferença significativa entre os grupos. Igualmente, obteve-se expressão significativamente maior de TNF- α no íleo terminal dos ratos idosos com Pancreatite Aguda. Interessantemente, as dosagens de citocinas séricas foram semelhantes entre os grupos, demonstrando que a diferença entre a resposta inflamatória de ratos idosos e jovens é localizada. Peptídeos antimicrobianos, portanto, devem apresentar um papel central na resposta inflamatória decorrente de injúria pancreática.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos. Pancreatite aguda. Citocinas pró-inflamatórias. Alfa-defensina 5. Alfa-defensina 7.

ABSTRACT

Cunha, DMG. Expression of antimicrobial peptides in the intestinal mucosa of aged rats submitted to an acute pancreatitis model [Dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2014.81 f.

Antimicrobial peptides, also called AMPs, are 12-50 amino acids molecules that have antimicrobial and immunoregulatory properties. AMPs are produced mainly in epithelial cells, and participate in the homeostasis of the intestinal barrier. Acute pancreatitis (AP) is a disease with high mortality and morbidity and presents a worst outcome when bacterial translocation occurs to the intestinal epithelium and to the bloodstream. Bacterial translocation occurs mainly due to the failure of the intestinal barrier. In the elderly, AP has a worst prognosis, but the mechanisms that justify that higher severity, compared to the young, are poorly understood. The objective of this work is to study the gene expression levels of antimicrobial peptides α -defensins 5 and 7 and the cathelicidin CRAMP in young and elderly rats submitted to acute pancreatitis. Young and old rats received a taurocholic acid 2.5% injection in the pancreatic ductus and after twelve hours, were sacrificed. 1cm of the terminal ileum was collected for detection of AMPs gene expression levels. In addition, RT-PCR was performed to detect TNF- α and IL-10 mRNA levels. Using Milliplex technique, serum levels of IFN-gamma, IP-10, IL-10, IL-6, IL-18, TNF- α , IL-1 β and Leptin were measured. As a result, we detected significant higher mRNA levels of α -defensins 5 and 7 in the elderly (pancreatitis group). CRAMP gene expression was not significantly different between groups. TNF- α gene expression levels was significantly higher in old rats (pancreatitis group). Any difference in the cytokines serum levels could be detected when old and young rats in the pancreatitis groups were compared. We conclude that AMPs may play a pivotal role in the development of acute pancreatic injury.

Keywords: Antimicrobial peptides. Acute pancreatitis. Pró-inflammatory cytokines. Alpha-defensin5. Alpha-defensin7.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representando os domínios do inflamassoma NLR3.....	19
Figura 2 – Esquema de um enterócito durante a homeostase e a infecção.....	21
Figura 3 – Esquema de eventos que ocorrem na Pancreatite Aguda e sua relação com a barreira intestinal.	22
Figura 4 – Esquema de eventos que ocorrem na Pancreatite Aguda e sua relação com a barreira intestinal.	24
Figura 5 – Expressão de α -defensina 7 no intestino de ratos jovens e idosos submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.	35
Figura 6 – Expressão de α -defensina 5 no intestino de ratos jovens e idosos submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.	36
Figura 7 – Expressão de CRAMP no intestino de ratos jovens e idosos submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.	36
Figura 8 – Expressão de TNF- α no intestino de ratos jovens e idosos submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.	37
Figura 9 – Dosagem plasmática de TNF- α nos grupos Controle Idoso (CI); Pancreatite Idoso (PI); Controle Jovem (CJ); Pancreatite Jovem (PJ); Sham Jovem (SJ) e Sham Idoso (SI).....	38
Figura 10 – Dosagem plasmática de IL-10 nos grupos: Controle Idoso (CI); Pancreatite Idoso (PI); Controle Jovem (CJ); Pancreatite Jovem (PJ); Sham Jovem (SJ); e Sham Idoso (SI).....	38
Figura 11 – Dosagem plasmática de IL-6 nos grupos: Controle Idoso (CI); Pancreatite Idoso (PI); Controle Jovem (CJ); Pancreatite Jovem (PJ); Sham Jovem (SJ); e Sham Idoso (SI).....	39
Figura 12 – Dosagem plasmática de IL-1 β nos grupos: Controle Idoso (CI); Pancreatite Idoso (PI); Controle Jovem (CJ); Pancreatite Jovem (PJ); Sham Jovem (SJ); e Sham Idoso (SI).....	40
Figura 13 – Dosagem plasmática de IFN- γ nos grupos: Controle Idoso (CI); Pancreatite Idoso (PI); Controle Jovem (CJ); Pancreatite Jovem (PJ); Sham Jovem (SJ); e Sham Idoso (SI).....	41
Figura 14 – Dosagem plasmática de IL-18 nos grupos: Controle Idoso (CI); Pancreatite Idoso (PI); Controle Jovem (CJ); Pancreatite Jovem (PJ); Sham Jovem (SJ); e Sham Idoso (SI).....	41
Figura 15 – Dosagem plasmática de IP-10 nos grupos: Controle Idoso (CI); Pancreatite Idoso (PI); Controle Jovem (CJ); Pancreatite Jovem (PJ); Sham Jovem (SJ); e Sham Idoso (SI).....	42
Figura 16 – Dosagem plasmática de Leptina nos grupos: Controle Idoso (CI); Pancreatite Idoso (PI); Controle Jovem (CJ); Pancreatite Jovem (PJ); Sham Jovem (SJ); e Sham Idoso (SI).....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de <i>primers</i> utilizados, temperatura de Annealling e produto gerado na RT-PCR.....	32
---	----

LISTA DE SIGLAS

AMPs	<i>Antimicrobial peptides</i>
CEIs	Célulasepiteliaisintestinais
CI	Controleldoso
CJ	ControleJovem
CLP	Modelo de ligadura e punção cecal
CRAMP	Peptídeo antimicrobiano catelicidina de ratos
FPRL-I	<i>Formyl peptide receptor like 1</i>
MMP7	<i>Matrix metallo-proteínase</i>
MODS	Disfunção de múltiplos órgãos
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NLR	<i>Nod like Receptor</i>
PA	PancreatiteAguda
PAF	Fator ativador plaquetário
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PI	Pancreatiteldoso
PJ	PancreatiteJovem
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TG	Trato gastrointestinal
TLR	<i>Tolllike receptor</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Classificação dos AMPs e sua atuação na barreira intestinal	16
1.2 Relação entre Pancreatite Aguda e barreira intestinal	21
1.3 O papel das citocinas na Pancreatite Aguda	23
1.4 Pancreatite Aguda e senilidade	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivos específicos	28
3 MÉTODOS	29
3.1 Local de realização dos experimentos	29
3.2 Amostra	29
3.3 Técnicas	30
3.3.1 Modelo animal de Pancreatite Aguda	30
3.3.2 Técnicas moleculares	30
3.3.3 Análise da expressão gênica – RT-PCR	31
3.3.4 Quantificação de interleucinas por Milliplex	32
3.4 Análise estatística	33
4 RESULTADOS	34
4.1 Expressão gênica de Peptídeos Antimicrobianos	34
4.1.1 Expressão de α -defensina 7	34
4.1.2 Expressão de α -defensina 5	35
4.1.3 Expressão de CRAMP	36
4.2 Dosagem e expressão gênica de Interleucinas Pró e Anti-inflamatórias	37
4.2.1 Expressão gênica e dosagem plasmática de TNF- α	37
4.2.2 Dosagem plasmática de IL-10	38
4.2.3 Dosagem de IL-6	39
4.2.4 Dosagem de IL-1 β	39
4.2.5 Dosagem de IFN- γ	40
4.2.6 Dosagem de IL-18	41
4.2.7 Dosagem de IP-10	42
4.2.8 Dosagem de Leptina	42
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	53
APÊNDICE	66

1 INTRODUÇÃO

Peptídeos antimicrobianos, que também podem ser chamados de AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*, são compostos produzidos pelos organismos multicelulares pertencentes tanto ao reino animal quanto ao vegetal. Pertencente à imunidade nata, têm como função proteger esses organismos contra patógenos, além de possuírem amplo espectro de ação, já tendo sido registrada sua atuação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, protozoários, fungos e vírus. São moléculas muito antigas que persistiram ao longo da evolução até o presente momento por sua capacidade de tornar a imunidade inata competente contra invasores.⁽¹⁻⁴⁾

Os AMPs são formados de um conjunto de aminoácidos e, por esse motivo, agregam as características de serem moléculas catiônicas e anfipáticas.⁽¹⁾ Geralmente são moléculas pequenas, constituídas de 12 a 50 aminoácidos com resíduos de argininas e lisinas (o que confirma sua carga positiva).

Conhecer a estrutura molecular dos AMPs é fundamental para o entendimento de seu mecanismo de ação, bem como para sua classificação. Eles podem ser classificados em quatro categorias: aqueles que possuem alfa-hélice; os que apresentam estrutura em *beta-sheet* estabilizados por pontes dissulfídicas; e, por último, aqueles em forma de *loop* ou em forma estendida.^(2,3)

Possuem mecanismo de ação muito peculiar devido à sua estrutura química. Na literatura acadêmica médica, é possível encontrar alguns tipos de mecanismos de ação dos AMPs, dependendo de sua estrutura molecular; porém, aqui, será ressaltado seu principal e mais conhecido mecanismo: o de ruptura da membrana ou parede celular do organismo invasor. Dessa forma, as bactérias, por possuírem parede celular carregada negativamente, ligam-se fortemente aos AMPs catiônicos, o que gera uma ligação eletrostática entre eles e provoca inúmeros poros quando se inserem na parede celular, levando à desintegração do envoltório e consequentemente à lise celular.^(1,4,5)

Um tópico interessante que merece destaque é o fato de os AMPs serem produzidos principalmente nos epitélios. O epitélio intestinal, a pele, o trato respiratório e o aparelho reprodutivo são alvos dessas moléculas, devido ao fato de

esses tecidos estarem constantemente em contato com o ambiente externo e, consequentemente, mais expostos a micro-organismos.^(6,7)

Os AMPs participam de importantes rotas tanto em estados patológicos quanto em organismos saudáveis. Neste trabalho, a atenção estará concentrada na expressão de peptídeos antimicrobianos no epitélio intestinal e em sua contribuição na homeostase e no estado patológico desse sistema.

1.1 Classificação dos AMPs e sua atuação na barreira intestinal

A imunidade inata, primeira linha de defesa do organismo humano, confere proteção contra a invasão de micro-organismos e também a estados inflamatórios. Assim como os AMPs, os PRRs (*patternrecognitionreceptors*) são moléculas pertencentes à imunidade inata que foram conservadas ao longo da evolução. No intestino, auxiliam as células epiteliais no reconhecimento de patógenos, promovendo a integridade e homeostase da barreira epitelial. A expressão de AMPs pode ser regulada de acordo com a presença de patógenos, estando ligada, portanto, aos PRRs *Toll-likereceptors* e *NOD-likereceptors*, que estão presentes nas células epiteliais do intestino.⁽⁸⁾

Desse modo, a barreira epitelial intestinal é organizada de forma a impedir a entrada de agentes patogênicos na lâmina própria do intestino. O epitélio é constituído por um tecido não estratificado contendo células epiteliais intestinais (CEIs) e coberto por uma camada espessa de muco. A região mais externa dessa camada é colonizada por bactérias comensais, enquanto a faixa mais interna, desprovida dessas bactérias, possui apenas AMPs e moléculas de IgA, o que impede, assim, o contato dos organismos comensais com células epiteliais intestinais. Eventualmente, essa barreira é rompida, gerando um estado patológico.^(6,7)

Existem cinco linhagens celulares principais na barreira intestinal, derivadas de células-tronco epiteliais: os enterócitos, que produzem alguns AMPs; as células enteroendócrinas, que secretam hormônios; as células caliciformes, que secretam a camada de muco; as células de Paneth, principal célula que produz AMPs; e as células M, que possuem antígenos presentes no lúmen para as células imunes.⁽⁷⁾

Os AMPs, portanto, encontram-se na faixa interna de muco e participam ativamente da barreira intestinal, contribuindo para a homeostase desta. Já foi identificada uma quantidade imensa de AMPs diferentes. Cada um deles se concentra em diferentes tipos de células e em espécies variadas. Em humanos, já foram identificadas diversas classes de AMPs, porém as de maior importância no trato gastrointestinal são as defensinas e as catelicidinas.⁽⁹⁾

As defensinas são moléculas constituídas por 30 a 40 aminoácidos e contêm seis resíduos de cisteínas, que participam na formação de pontes dissulfídicas. O alinhamento desses resíduos é conservado e define duas famílias distintas: α -defensinas e β -defensinas.

Em mamíferos, foram identificadas cerca de 50 α -defensinas e 90 β -defensinas nos grânulos dos neutrófilos, nas células de Paneth, nos queratinócitos e nos epitélios dos tratos digestivo, respiratório, urinário e reprodutor.

As α -defensinas (conhecidas como criptidinas em camundongos) são largamente produzidas por células de Paneth e neutrófilos de humanos, ratos e outros mamíferos, mas não por camundongos, cujos neutrófilos não expressam defensinas. Em células de Paneth e neutrófilos, a expressão de α -defensinas é basicamente constitutiva e fica armazenada como pró-peptídeos nos grânulos dessas células, necessitando de clivagem proteolítica para sua efetiva atuação.⁽¹⁰⁾ As criptidinas, por sua vez, são ativadas por MMP7 (*matrixmetallo-proteinase*⁽⁷⁾) presentes nos grânulos, enquanto as α -defensinas HD-5 e HD-6 (AMPs mais abundantes no trato gastrointestinal – TG) são processadas pela tripsina após sua liberação.⁽¹¹⁻¹³⁾

As β -defensinas são produzidas por diversos tipos de células epiteliais, incluindo enterócitos. Sua expressão no epitélio intestinal é induzível, com exceção de β -defensina1 (HBD1), que tem expressão constitutiva. As β -defensinas HBD2, HBD3 e HBD4 são produzidas mediante contato com patógeno.^(14,16)

Tanto as α -defensinas quanto as β -defensinas são bactericidas e atuam contra Gram-negativas e Gram-positivas. Algumas defensinas também têm atividade contra fungos, vírus e protozoários. Além disso, possuem propriedades citotóxicas e quimiotáticas aos mais diversos alvos, promovendo a conexão das respostas inflamatórias da imunidade inata com a imunidade adaptativa.⁽¹⁶⁾

Ademais, esses mediadores contribuem para o recrutamento e a ativação de diferentes populações de leucócitos⁽¹⁷⁾ e muitas vezes são capazes de se

ligandiretamente aos receptores de quimiocinas CCR6 e CCR2. Conforme resultados de Rohrl et al.(2010), essas moléculas atuam como “micro-quimiocinas” capazes de recrutar leucócitos para o sítio da infecção.⁽¹⁸⁾

As catelicidinas são um grupo de AMPs com um pró-peptídeo no segmento N-terminal (cathelin) e um domínio C-terminal que têm propriedades bactericidas. Em mamíferos, a catelicidina é uma classe importante de AMPs e é produzida por células epiteliais e fagócitos. Humanos e camundongos produzem apenas uma catelicidina cada, LL-37 e CRAMP, respectivamente.

Nos últimos anos, diversas publicações têm demonstrado outras funções das catelicidinas, além da sua função bactericida.⁽¹⁹⁻²¹⁾ As catelicidinas LL-37 e CRAMP também são capazes de exercer efeitos biológicos adicionais sobre fagócitos, células epiteliais e endoteliais, como supressão da resposta inflamatória induzida por LPS, apoptose, angiogênese, reparo tecidual e processamento de IL-1 β .⁽²²⁾ A vitamina D induz potente expressão gênica de LL-37, porém o mecanismo responsável por essas funções imunomoduladoras é ainda pouco compreendido.⁽²³⁾

Menard et al.(2008) demonstraram um importante papel de CRAMP em ratos neonatos. Nas duas primeiras semanas de vida, houve interrupção na expressão de CRAMP no epitélio intestinal, o que os autores atribuíram ao período de colonização bacteriana e homeostase intestinal desses animais.⁽²⁴⁾ Adicionalmente, Agerberth et al. (2000) mostraram que LL-37 interage com FPRL-1 (*formylpeptide receptor like 1*), contribuindo, dessa maneira, para o recrutamento de granulócitos, monócitos e linfócitos T para o sítio da infecção.⁽²⁵⁾

É também interessante ressaltar a ligação direta do reconhecimento de PAMPs (*microbial-associated molecular patterns*) pelos *Toll-like receptors* (TLR) e *Nod-like receptors* (NLR), com a consequente ativação do fator nuclear kappaB (NF- κ B) e a subsequente liberação de citocinas, quimiocinas pró-inflamatórias e AMPs.⁽⁷⁾

As citocinas IL-1 β e IL-18 são interleucinas cruciais em processos inflamatórios, sejam eles crônicos ou agudos. Essas moléculas aparecem em inflamações locais e sistêmicas, e sua síntese e ativação estão relacionadas com vias complexas da imunidade inata.

Essas vias compreendem um primeiro sinal, que culminará na ativação do NF- κ B, induzindo, subsequentemente, a formação de pró-IL-1 β e pró-IL-18, e um segundo sinal, que está diretamente ligado a complexos de proteínas denominadas

inflamassomas, os quais ativarão a Caspase-1, que, por sua vez, converterá as citocinas citadas anteriormente em moléculasativas.⁽²⁶⁾

Inflamassomas são complexos proteicos pertencentes à classe dos NLRs, que, por sua vez, são Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRR).

Ao contrário dos TLRs, que se localizam na membrana celular, os NLRs são citoplasmáticos e podem ser classificados em três famílias: NOD, IPAF e NLRP, de acordo com as subunidades proteicas que apresentam. A subunidade NACHT é comum para todas as famílias dos NLRs; no entanto, outras subunidades estão presentes conforme o grupo a que pertencem. As subunidades mais importantes são: LRR, CARD e PYD.^(26,27)

O inflamassoma NLRP3 (Figura 1) é o mais bem conhecido e é sabido que está relacionado com a inflamação intestinal. Consiste dos domínios NACHT, LRR e PYD, contendo uma proteína adaptadora ASC que se ligará à pró-Caspase, por meio de um domínio CARD. Após a autoclivagem do domínio CARD, as subunidades p10 e p20 da pró-Caspase-1 se ligarão a outro dímero p10-p20, formando, então, a Caspase-1 ativa.^(26,27)

Figura 1– Esquema representando os domínios do inflamassoma NLR3.
Adaptado de Schroder K.eTschopp J. 2010.

Conforme mencionado anteriormente, a ativação dos inflamassomas requer dois sinais: o primeiro pode ser o reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) pelos TLRs, o que implica a ativação de NF-κB e

subsequente transcrição gênica para formação dos pró-IL-1 β e pró-IL-18; o segundo sinal, em que vários mecanismos são propostos (entre eles, o ATP extracelular), induz a formação do poro P2X7 na membrana, exteriorizando potássio e permitindo, assim, a formação de canais de panexina-1 e a entrada de PAMPs no interior da célula que, então, ativam NLRP3. Outro mecanismo proposto é a fagocitose de partículas ligantes, que, após o rompimento dos fagossomos, ativam NLRP3.⁽²⁶⁾

Existem evidências de doenças inflamatórias relacionadas à disfunção de inflamassomas, entre elas a Doença de Chron, cuja causa, como mostraram Schoultz et al. (2009), pode estar nos polimorfismos nos genes NLRP3 e CARD8.⁽²⁷⁾

Evidências também sugerem que a produção de AMPs pelas células de Paneth pode estar relacionada com os TLRs, por meio da molécula adaptadora MyD88. Camundongos transgênicos que expressaram a forma mutante negativa dominante de MyD88 e camundongos em que estava ausente a MyD88 tiveram decréscimo na produção de criptidinas pelas células de Paneth.⁽²⁸⁾

Ademais, Di Nardo et al. (2007) e Gallo e Hooper (2012) demonstram que as catelicidinas podem interagir diretamente com TLR, assim como as endotoxinas flagelinas e LPS. Por exemplo, a presença de LL-37 ativo interfere na maturação da célula Th17 pela ativação de TLR9, o que leva à produção de Interferon tipo I. Assim, compreende-se que as consequências dessas interações podem fazer com que os AMPs matem os patógenos por meio de seus mecanismos de ação bactericida, como também podem neutralizar respostas inflamatórias exacerbadas.^(6,21)

Dessa forma, pode-se sumarizar a relação dos AMPs com os PRRs em duas fases distintas: 1) durante a homeostase, quando os padrões moleculares associados a patógenos das bactérias comensais são reconhecidos pelos receptores de padrões de reconhecimento, levando à produção de AMPs e IL-18 pela ativação de NF- κ B; 2) durante o estado patológico, em que os patógenos rompem a barreira intestinal, havendo o reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos pelos receptores de padrões de reconhecimento, além de induzir a ativação da molécula MyD88 ou dos complexos de inflamassomas, o que ocasiona a produção de AMPs e citocinas pró-inflamatórias, conforme mostrado na Figura 2.

Figura 2– Esquema de um enterócito durante a homeostase e a infecção.

1.2 Relação entre Pancreatite Aguda e barreira intestinal

Conforme mencionado, a barreira intestinal tem grande importância na homeostase do organismo humano, de modo que, ao interromper o seu perfeito funcionamento, originam-se doenças graves com altas taxas de mortalidade e morbidade. Pode-se citar, por exemplo, a Pancreatite Aguda (PA), que é uma patologia cujas etiologias são variadas, sendo o alcoolismo e o cálculo biliaras causas mais comuns.⁽²⁹⁾

A barreira intestinal, portanto, possui papel muito importante no curso da PA, pois, caso haja falência nessa barreira, o risco de infecções pancreáticas e até mesmo sistêmicas torna-se muito alto, contribuindo significativamente para a piora no prognóstico da doença.

Apesar dos recentes avanços em terapia intensiva e nos exames diagnósticos, o tratamento da PA continua sendo um desafio para a medicina, visto que o índice de mortalidade varia de 20 a 25%,⁽³¹⁻³²⁾ mesmo quando tratada em

centros especializados, podendo se tornar superior a 40% em casos de infecção pancreática.⁽³⁰⁻³²⁾

A PA se inicia com uma disfunção nas células acinares do pâncreas, que ativam indevidamente o tripsinogênio, transformando-o em tripsina e fazendo com que esse órgão produza enzimas de autodigestão no tecido pancreático, o que pode ocasionar o extravasamento destas para o tecido peripancreático. Uma vez ocorrido o extravasamento, as células dos órgãos adjacentes sofrem digestão por essas enzimas, o que ocasiona lesões graves.⁽³³⁻³⁵⁾

O curso natural da pancreatite se dá geralmente em duas fases: a primeira ocorre durante os primeiros 15 dias, caracterizada por SIRS (Síndrome da resposta inflamatória sistêmica), na ausência de infecção; a segunda fase acontece, geralmente, duas semanas após o início da doença, caracterizando-se por infecção e necrose pancreática, além de complicações relacionadas à sepse (Figura 3).⁽³³⁾

Figura 3– Esquema de eventos que ocorrem na Pancreatite Aguda e sua relação com a barreira intestinal. Adaptado de Capurso et al. 2012.

Dessa forma, a PA é uma doença que não deve ser compreendida apenas em nível pancreático, visto que costuma gerar consequências a órgãos distantes, como rins, fígado, intestino e pulmão. A alta taxa de mortalidade e morbidade está relacionada com o grau da lesão pancreática, e, principalmente, com a exacerbada resposta inflamatória, que proporciona a liberação de diversos mediadores

inflamatórios, como TNF- α , interleucinas 1, 6 e 8, e fator ativador plaquetário (PAF).⁽³⁶⁻³⁹⁾

O intestino delgado é um dos órgãos distantes mais afetados na PA, devido à perturbação na microcirculação, hipovolemia, vasoconstrição e até mesmo isquemia-reperusão. Ele desempenha papel importante, e, a partir do momento em que ocorrem esses fatos citados, sobrevém a falência da barreira intestinal, que contribui muito para a translocação de bactérias e endotoxinas para o pâncreas e para a corrente sanguínea.⁽³³⁾

Yang e Gao (2005) demonstraram que em estados patológicos, como PA, quimioterapia, radioterapia e infecção severa, a estrutura e função da barreira intestinal sofrem graves alterações patológicas, como a diminuição da altura e da largura das microvilosidades das células entéricas, assim como o aumento da apoptose dessas células.

Todas essas modificações levam ao aumento da permeabilidade intestinal, que, por sua vez, desencadeia a translocação de bactérias e endotoxinas, bem como a ativação de células endoteliais, ocasionando distúrbios na microcirculação e a liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Esses mediadores inflamatórios são responsáveis pelos sintomas de insuficiência respiratória, insuficiência renal, instabilidade hemodinâmica e alterações na permeabilidade vascular, que compõem a SIRS, podendo levar posteriormente à insuficiência de múltiplos órgãos (MODS).⁽⁴⁰⁾

1.30 papel das citocinas na Pancreatite Aguda

A progressão da pancreatite aguda pode ser sumarizada em três fases: inflamação local do pâncreas; resposta inflamatória generalizada e estágio final de sepse; e falência de múltiplos órgãos. Até o momento, o tratamento da PA continua o mesmo de tempos atrás e não tem sido amplamente eficiente para reduzir o processo inflamatório intenso.

O prognóstico da PA está diretamente relacionado com a intensidade da sua resposta inflamatória. Níveis elevados de interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose

tumoral α (TNF- α) estão relacionados com a gravidade da doença, podendo, inclusive, ser utilizados na clínica para inferir a intensidade do processo inflamatório.^(37,41-44)

Após lesões iniciais das células acinares do pâncreas, ocorre a ativação de células inflamatórias, como neutrófilos, macrófagos, células T e células endoteliais, que amplificam a cascata inflamatória com a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1, IL-6, e óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio e metabólitos do ácido aracdônico.

Uma resposta anti-inflamatória também é observada com a produção de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10 e IL-4. Denominada síndrome compensatória anti-inflamatória (CARS), ocasiona uma depressão no sistema imune, aumentando a suscetibilidade a infecções.

As células inflamatórias citadas anteriormente também contribuem com a produção de quimiocinas, que, por sua vez, recrutam mais células inflamatórias.⁽⁴⁵⁾

Figura 4– Esquema de eventos que ocorrem na Pancreatite Aguda e sua relação com a barreira intestinal.

Adaptado de Capurso et al. 2012.

Numerosos estudos clínicos e experimentais têm sido realizados com o objetivo de compreender o processo inflamatório, bem como os principais mediadores envolvidos na PA.^(41,42,45)

Um dos principais mediadores inflamatórios é o IL-6, responsável por recrutar linfócitos T e pela disfunção da barreira intestinal. Estudo em que foi dosado IL-6 em pacientes com PA grave e PA leve indica que quanto mais elevados os níveis de IL-6, maior a gravidade da pancreatite.⁽⁴⁵⁾

O TNF- α também tem sido muito estudado, por ter relação com a SIRS e, por conseguinte, com a PA.⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾ Apesar de sua difícil quantificação no plasma sanguíneo, alguns trabalhos mostram o seu aumento de 30 a 40% em pacientes com PA. Estudos genéticos tentaram demonstrar a relação de polimorfismos no gene TNF e a incidência de pancreatite, porém, a relação não foi comprovada.⁽⁴⁵⁾ Ele é responsável pela ativação de neutrófilos, pelas alterações hemodinâmicas e pela permeabilidade vascular, além de produzir novos mediadores inflamatórios, como IL-6.⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾

A IL-10, que é uma interleucina anti-inflamatória, também está relacionada, de forma positiva, com a gravidade da doença. Essa citocina tem como função amenizar a resposta inflamatória exacerbada do organismo, reduzindo os níveis de IL-1, IL-6 e TNF- α .⁽⁴⁵⁾

A interleucina 1 (IL-1), por sua vez, é muito importante na cascata inflamatória na PA, visto que proporciona recrutamento e desgranulação dos neutrófilos e expressão de moléculas de adesão. Tem papel sinérgico com TNF- α , diferindo este por não causar apoptose diretamente.⁽⁴⁵⁾

1.4 Pancreatite Aguda e senilidade

Muitos estudos têm relatado a relação da senilidade com respostas inflamatórias exacerbadas. Claras evidências mostram que pacientes com idade avançada têm suscetibilidade maior a infecções pós-operatórias, em processos de isquemia-reperfusão e durante a sepse.

Franceschi et.al. (2000)⁽⁵¹⁾ relatam a possibilidade de esses eventos estarem relacionados com a exaustão do sistema imune, o qual fica apto a produzir maior quantidade de citocinas inflamatórias e outros fatores de crescimento relacionados à infecção.

Outros estudos também mostram que não somente a imunidade inata é afetada durante a senilidade, mas também a adaptativa, que sofre com a diminuição de linfócitos T, devido à involução do timo, de CD4 e CD8.⁽⁵²⁾ Esse estado de exaustão do sistema imunológico é denominado por alguns autores como *inflammaging*.⁽⁵³⁻⁵⁶⁾

Tateda et al. (1996) demonstraram que animais idosos exibem níveis mais elevados de TNF- α , IL-1 β e IL-6 do que camundongos jovens, após injeção intraperitoneal de LPS.⁽⁵⁷⁾ Usando o modelo de ligadura e punção cecal (CLP), Turnbull et al. (2003) também relataram resultados semelhantes.⁽⁵⁸⁾ O mecanismo subjacente para a maior vulnerabilidade do idoso à infecção tem sido atribuído à quebra de barreiras anatômicas, doenças coexistentes ou a uma menor eficiência do sistema imune,⁽⁵⁹⁾ enquanto infecções latentes, como pelo citomegalovírus (CMV), podem agir como estímulo crônico do sistema inflamatório.^(60,61) Inflamação persistente tem sido associada a um maior risco de invasão bacteriana ao reduzir o recrutamento de neutrófilos e o *clearance* bacteriano.^(62,63) Turnbull et al. (2003) propuseram que macrófagos de camundongos idosos estão parcialmente ativados, ou “primed”, para a produção de citocinas.

Tem havido, entretanto, diversos relatos conflitantes quando a produção *in vitro* de citocinas por células idosas é investigada.⁽⁶⁴⁻⁶⁷⁾ Um estudo clínico recente, por exemplo, foi incapaz de encontrar qualquer diferença relacionada à idade no perfil inflamatório de pacientes internados por pneumonia.⁽⁶⁸⁾ De maneira similar, Kelly et al. (2009) não encontraram diferenças no perfil de citocinas de pacientes jovens, idosos e muito idosos com pneumonia adquirida na comunidade.⁽⁶⁹⁾

Conforme visto, a PA é uma patologia com alta taxa de mortalidade, em torno de 20 a 25%.^(31,32) Quando o foco são pacientes de idade avançada, porém, esse índice sobe para 50%. Embora se tenha observado que as lesões pancreáticas locais e as peripancreáticas dos idosos não difiram do jovem, as lesões sistêmicas são muito mais intensas no idoso, o que contribui para a maior morbidade e mortalidade dessa população.⁽⁷⁰⁾

Os mecanismos que tornam pacientes idosos mais predispostos à MODS, porém, ainda são pouco compreendidos, e as especulações estão relacionadas com a resposta inflamatória, como citado anteriormente, que aumenta as possibilidades de ocorrer translocação bacteriana.

Por outro lado, cogita-se a hipótese de os idosos terem menor expressão de AMPs, visto que estudos de Tizslavicz et al. (2010)⁽⁷¹⁾ demonstram que um polimorfismo no número de cópias do gene da β -defensina (*copy number variation polimorfism*) está relacionado com a gravidade da PA: em outras palavras, a menor expressão de β -defensinas está diretamente ligada ao agravamento da doença.

Dessa forma, por haver uma quantidade escassa de estudos relacionados à expressão de AMPs e senilidade, por ainda não haver uma resposta que justifique a maior gravidade da inflamação no idoso e o modelo de PA em ratos representar muito bem o perfil inflamatório, propõe-se verificar, neste trabalho, a diferença de expressão gênica das α -defensinas 5 e 7, bem como do gene CRAMP, no intestino de ratos Wistar jovens e idosos submetidos ao modelo animal de PA. Também é foco deste estudo examinar a expressão das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10, IFN- γ , IP-10, IL-18 e Leptina e correlacioná-las com a expressão de AMPs.

2OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral comparar a expressão gênica de AMPs, α -defensinas 5 e 7 e de CRAMP no íleo terminal de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda. Busca-se também compreender como alterações na expressão de AMPs influenciam na gravidade da PA e em sua relação com a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias.

2.1 Objetivos específicos

De modo específico, este estudo busca:

- Verificar a expressão gênica de citocinas $\text{TNF-}\alpha$ e IL-10 no intestino de ratos jovens e idosos;
- Dosar as interleucinas IL-1 β , $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 e IL-10, $\text{INF-}\gamma$, IP-10, IL-18 e Leptina em soro dos animais deste experimento e dos controles.

3 MÉTODOS

3.1 Local de realização dos experimentos

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Emergências Clínicas (LIM-51) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP).

3.2 Amostra

Ratos Wistar, machos, de 280 a 350 gramas (grupo jovem) e de 400 a 550 gramas (grupo idoso). Os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP e mantidos em gaiolas no Biotério de Experimentação da Disciplina de Reumatologia (Departamento de Clínica Médica), com água, ração *ad libitum* e temperatura ambiente controlada. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de Cetamina (Parke-Davis, São Paulo, Brasil) – 75 mg/kg de peso do animal – e Xilazina (Bayer HealthCare, São Paulo, Brasil) – 10 mg/kg de peso do animal –, antes de todos os procedimentos cirúrgicos.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- Animais jovens submetidos à pancreatite durante 12 horas (n=10).
- Animais jovens controles (n=17).
- Animais idosos submetidos à pancreatite durante 12 horas (n=8).
- Animais idosos controles (n=10).
- Animais jovens grupo Sham (n=5).
- Animais idosos grupo Sham (n=4).

Deve-se mencionar que os animais são considerados jovens a partir do quarto mês depois do nascimento e idosos a partir do décimo oitavo mês após o nascimento. Ressalta-se que este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da USP, sob nº. 156/13.

3.3 Técnicas

3.3.1 Modelo animal de Pancreatite Aguda

Após a aplicação da anestesia, conforme citado, foi realizada uma laparotomia e a alça do duodeno foi exposta para visualização do ducto pancreático. Com agulha, perfurou-se o pâncreas a uma profundidade de 5mm abaixo da papila do ducto pancreático e, com uma cânula de polietileno PE-50 (Intracath, Becton-Dickson, USA), inseriu-se no ducto pancreático.

Esse ducto foi ligado por um *clamp* na porção superior do pâncreas, onde se injetou ácido taurocólico 2,5% (Sigma Chemical CompanyTM, St. Louis, USA), na dose de 0,1mL/100g de peso do animal. Após a injeção do ácido, o *clamp* foi retirado e o animal foi suturado.

Após 12 horas da indução de pancreatite aguda, os animais que foram submetidos a esse modelo foram sacrificados com doses letais de Ketamina e Xilazina, sendo as amostras de sangue e intestino coletadas e armazenadas em *freezera*-80°C para posterior análise.

As amostras de intestino foram pulverizadas em um recipiente que estava em contato com nitrogênio líquido. Então, foram maceradas e colocadas em tubos contendo 1mL de Trizol para cada 100 mg de tecido macerado.

3.3.2 Técnicas moleculares

O trabalho foi executado em três etapas:

- 1) Determinação por RT-PCR de mRNA de α -defensinas 5 e 7 e de CRAMP em intestino de ratos idosos e jovens submetidos à Pancreatite Aguda, bem como em controles saudáveis.
- 2) Análise da expressão gênica das citocinas TNF- α e IL-10, por RT-PCR, no epitélio intestinal de ratos idosos e jovens com pancreatite e em controles saudáveis.
- 3) Dosagem plasmática por Milliplex das interleucinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10, INF- γ , IP-10, IL-18 e Leptina.

3.3.3 Análise da expressão gênica – RT-PCR

Para extração de mRNA dos tecidos de intestino pulverizados, adicionaram-se 200 μ L de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol, incubaram-se por 3 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente, foram centrifugados, por 15 minutos, 12.000g a 4°C. Aspirou-se e transferiu-se o sobrenadante (fase incolor) para outro tubo. Adicionaram-se 500 μ L de isopropanol gelado e incubaram-se os tecidos por 10 minutos em temperatura ambiente. Verteram-se os tubos algumas vezes e centrifugaram-se, por 15 minutos, 12.000g a 4°C. Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante, vertendo o tubo e localizando o *pellet*. Adicionou-se 1 mL de etanol gelado 70%, soltou-se o *pellet* e centrifugaram-se os tecidos mais uma vez, por 10 minutos, 12.000g a 4°C. Após a centrifugação, verteu-se, novamente, o sobrenadante e aguardou-se por 5 minutos para evaporar o etanol, e, então, suspenderam-se novamente em 30 μ L de água DEPC.

Após a extração de RNA, fez-se o tratamento deste com DNase: diluíram-se 2 μ L de DNase I em 200 μ L de *buffer* de DNase. Acrescentaram-se 4 μ L dessa diluição em cada amostra de RNA extraído e incubou-se por 10 minutos. Adicionou-se 1 μ L de EDTA em cada amostra e incubou-se a 65°C por 10 minutos.

As amostras foram então quantificadas usando o biofotômetro Eppendorf e, posteriormente, submetidas ao aparelho de PCR em tempo real.

Os *primers* utilizados estão elencados na Tabela 1.

Tabela 1– Sequência de *primers* utilizados, temperatura de Annealing e produto gerado na RT-PCR.

Nome do Gene	Sequência De <i>Primers</i>	Temperatura de Annealing	Ciclos
DEFa-7 rat	sense: ATGAGGACGCTCACTCTG CT anti-sense: ATCCCCTCCAAAGGATATGG	60°C	40
DEFa-5 rat	sense: GGACGCTCACTCTGCTTA CC anti-sense: TCTTGGAGAGCAGTGCCTTT	60°C	40
rCRAMP	sense: AAGTATGTGAGGTTCCGAGTG AA anti-sense: ArCCAAACTTCTCTCCACCTTTTC	60°C	38
rTNF- α	sense: ACTCCCAGAAAAGCAAGC AA anti-sense: CGAGCAGGAATGAGAAGAGG	60°C	40
IL-10	sense: GAATTCCTGGGAGAGAAGC anti-sense: CGGGTGGTTCAATTTTTC AT	60°C	40
HousekeepingGAPDH rat	sense: ATGATT CTA CCCACGGCA AG anti-sense: CTGGAAGATGGTGATGGGTT	60°C	40

3.3.4 Quantificação de interleucinas por Milliplex

Para quantificação de interleucinas por Milliplex, foi utilizado o kit Millipore RatCytokine/ChemokineMagneticBeadPanel (RECYTMAG-65K).

Foram adicionados 200 μ L de Assay Buffer em cada poço da placa, a qual foi selada e mantida em um agitador de placas durante 10 minutos, em temperatura ambiente (20 a 25°C). Decorridos 10 minutos, decantou-se a placa e removeu-se o volume residual, invertendo-a em toalhas absorventes.

Foram adicionados 25 μ L de cada *Standard* ou Controle nos poços adequados. Adicionaram-se também 25 μ L de Assay Buffer nos poços da amostra. Acrescentaram-se 25 μ L de solução de matriz (especial para dosagem sérica) nos poços dos controles, *background* e *standards*.

Acrescentaram-se 25 μ L de amostra (diluída na proporção 1:2) nos seus poços específicos. Vortexamos o MixingBottle, tendo adicionado 25 μ L das *PremixedBead* em cada poço. Selou-se a placa, envolvendo-a com papel

alumínio, para incubá-la em agitação por 2 horas à temperatura ambiente (20 a 25 °C).

Após esse tempo, o conteúdo foi removido cuidadosamente, e a placa foi lavada duas vezes. Adicionaram-se 25 µL de Anticorpo de Detecção. Selou-se, cobriu-se com alumínio e incubou-se o conteúdo com agitação durante 1 hora.

Após incubação, foram adicionados 25 µL de Streptavidin-Phycoerythrin para cada poço da placa. Selou-se, cobriu-se com papel alumínio e incubou-se em agitação durante 30 minutos à temperatura ambiente (20 a 25 °C).

Passado o tempo necessário, removeu-se cuidadosamente o conteúdo e lavou-se a placa duas vezes. Adicionaram-se 125 µL de Sheath Fluid (*driving fluid* MAGPIX) em todos os poços e, posteriormente, a placa foi lida no MAGPIX com *software* Xponent.

3.4 Análise estatística

As características dos casos experimentais e controles foram comparadas por intermédio do teste de ANOVA, bem como pelo cálculo do respectivo intervalo de confiança de 95% (IC95%); e um valor de *P* bi-caudado de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa estatístico Graphpad Prisma 5.0 Demo para Windows e também do Microsoft Office Excel 2013.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram divididos em duas categorias: 1) expressão gênica de Peptídeos Antimicrobianos; 2) dosagem e expressão gênica de Interleucinas Pró e Anti-inflamatórias.

4.1 Expressão gênica de Peptídeos Antimicrobianos

4.1.1 Expressão de α -defensina7

A Figura 5 representa a expressão de α -defensina7 no intestino de ratos Wistar dos grupos estudados: Controle Jovem; Pancreatite Jovem; Controle Idoso; e Pancreatite Idoso.

Pode-se observar que o grupo Pancreatite Idoso possui expressão de α -defensina7 significativamente maior quando comparado aos demais grupos. Para análise dos dados, utilizaram-se o teste de ANOVA *one-way* e o teste *post-hoc* de Tukey, ambos obtendo resultados de p -valor $< 0,05$.

Figura 5— Expressão de α -defensina7 no intestino de ratos jovens e idosos submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.

4.1.2 Expressão de α -defensina5

No estudo da expressão de α -defensina5 dos grupos em questão, notou-se que o grupo Pancreatite Idoso obteve expressão estatisticamente significante maior em relação aos demais (Figura 6).

Os grupos Controle Jovem e Pancreatite Jovem não obtiveram diferença estatística quando comparados. O teste aplicado foi o ANOVA *one-way* e o pós-teste foi o Tukey, em que o grupo Pancreatite Idoso obteve $p\text{-valor} < 0,05$, quando comparado aos demais.

Figura 6— Expressão de α -defensina5 no intestino de ratos jovens e idosos submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.

4.1.3 Expressão de CRAMP

O gráfico demonstra que os grupos Pancreatite Jovem e Idoso apresentam maior expressão de catelicidina CRAMP em comparação aos controles; no entanto, essa diferença nos demais grupos não chega a ser estatisticamente significativa(Figura 7).

Figura 7— Expressão de CRAMP no intestino de ratos jovens e idosos submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.

4.2 Dosagem expressão gênica de Interleucinas Pró e Anti-inflamatórias

4.2.1 Expressão gênica e dosagem plasmática de TNF- α

Oteve-se como resultado da expressão gênica de TNF- α uma maior expressão da referida citocina no macerado intestinal do grupo Pancreatite Idoso. O teste aplicado para comparar os grupos estudados foi o ANOVA com pós-teste de Tukey, em que se obteve $p < 0,05$ quando comparado o grupo Pancreatite Idoso com os demais. Em comparação entre os grupos Pancreatite Jovem e Pancreatite Idoso, verificou-se que este último apresenta uma expressão aumentada de TNF- α (Figura 8).

Figura 8— Expressão de TNF- α no intestino de ratos jovens e idosos submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.

No entanto, quando se observa a Figura 9, referente à dosagem plasmática de TNF- α , verifica-se um perfil diferente daquele encontrado na expressão gênica intestinal, em que a dosagem desta citocina apresenta valores aproximados em todos os grupos, não revelando diferença estatística; porém, ressalta-se que o grupo Pancreatite Jovem apresentou a dosagem discretamente maior em relação aos demais grupos.

Figura 9– Dosagem plasmática de TNF- α nos grupos Controle Idoso (CI); Pancreatite Idoso (PI); Controle Jovem (CJ); Pancreatite Jovem (PJ); Sham Jovem (SJ) e Sham Idoso (SI).

4.2.2 Dosagem plasmática de IL-10

Na dosagem plasmática de IL-10 (Figura 10), é possível observar que o grupo Pancreatite Idoso apresenta a dosagem desta interleucina um pouco maior do que o grupo Pancreatite Jovem, não chegando esta diferença a ser estatisticamente significativa. Por sua vez, há diferença estatística quando comparados os grupos Pancreatite Idoso e Sham Jovem.

Figura 10– Dosagem plasmática de IL-10 nos grupos: Controle Idoso (CI); Pancreatite Idoso (PI); Controle Jovem (CJ); Pancreatite Jovem (PJ); Sham Jovem (SJ); e Sham Idoso (SI).

4.2.3 Dosagem de IL-6

Na dosagem plasmática de IL-6 (Figura 11), foram obtidos valores estatisticamente significantes quando comparados os grupos Pancreatite Idoso e Pancreatite Jovem com os demais grupos. Porém, não houve diferença estatística entre os grupos Pancreatite Idoso e Jovem. Para essa análise, foram utilizados o teste não paramétrico de Kruskal Wallis e o pós-teste de Dunns.

Figura 11– Dosagem plasmática de IL-6 nos grupos: Controle Idoso (CI); Pancreatite Idoso (PI); Controle Jovem (CJ); Pancreatite Jovem (PJ); Sham Jovem (SJ); e Sham Idoso (SI).

4.2.4 Dosagem de IL-1 β

Na dosagem plasmática de IL-1 β , não houve diferença estatística entre os grupos estudados. Foram realizados o teste de Kruskal Wallis e o pós-teste de Dunns.

Figura 12– Dosagem plasmática de IL-1 β nos grupos: Controle Idoso (CI); Pancreatite Idoso (PI); Controle Jovem (CJ); Pancreatite Jovem (PJ); Sham Jovem (SJ); e Sham Idoso (SI).

4.2.5 Dosagem de IFN- γ

Na dosagem de IFN- γ (Figura 13), todos os grupos apresentaram comportamento parecido, não havendo, portanto, diferença estatística quando realizados o teste de Kruskal Wallis e o pós-teste de Dunns. Ressalta-se, porém, que o grupo Pancreatite Jovem apresentou os maiores valores em comparação aos outros grupos.

Figura 13– Dosagem plasmática de IFN- γ nos grupos: Controle Idoso (CI); Pancreatite Idoso (PI); Controle Jovem (CJ); Pancreatite Jovem (PJ); Sham Jovem (SJ); e Sham Idoso (SI).

4.2.6 Dosagem de IL-18

Na dosagem de IL-18 (Figura 14), não houve diferença estatística entre os grupos analisados. Estes apresentaram basicamente o mesmo padrão de dosagem. O grupo Controle Jovem apresentou um grande desvio padrão em comparação aos outros grupos.

Figura 14– Dosagem plasmática de IL-18 nos grupos: Controle Idoso (CI); Pancreatite Idoso (PI); Controle Jovem (CJ); Pancreatite Jovem (PJ); Sham Jovem (SJ); e Sham Idoso (SI).

4.2.7 Dosagem de IP-10

A análise de IP-10 (Figura 15) foi realizada com o teste de Kruskal Wallis, obtendo-se $p < 0,05$, e no pós-teste de Dunns, ao se compararem as médias, também se encontrou $p < 0,05$ entre os grupos Pancreatite Idoso e Sham Jovem.

Figura 15 – Dosagem plasmática de IP-10 nos grupos: Controle Idoso (CI); Pancreatite Idoso (PI); Controle Jovem (CJ); Pancreatite Jovem (PJ); Sham Jovem (SJ); e Sham Idoso (SI).

4.2.8 Dosagem de Leptina

Na dosagem de Leptina, encontrou-se $p < 0,05$ no teste de Kruskal Wallis e também no pós-teste de Dunns, quando comparados os grupos de animais idosos com os grupos de animais jovens.

Figura 16– Dosagem plasmática de Leptina nos grupos: Controle Idoso (CI); Pancreatite Idoso (PI); Controle Jovem (CJ); Pancreatite Jovem (PJ); Sham Jovem (SJ); e Sham Idoso (SI).

5DISCUSSÃO

O processo de envelhecimento tem sido bastante estudado pela comunidade científica, já que está estreitamente relacionado com doenças como Aterosclerose, Alzheimer, Diabetes tipo 2 e outras principais causas de óbito no mundo inteiro. A senilidade é associada a níveis cronicamente elevados de marcadores inflamatórios, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e proteína C-reativa.⁽⁷²⁾ A senescência parece influenciar diversos componentes do sistema imune. Alterações profundas na função de células T foram descritas em idosos,^(73,74) especialmente naquilo que se refere à atividade de células Th17 e T regulatórias.^(73,75) Em relação à imunidade inata, alterações ocasionadas pela idade têm sido descritas em macrófagos, células polimorfonucleares e natural-killer.^(76,77) Resultados discrepantes, entretanto, são observados frequentemente:⁽⁷⁸⁾ enquanto alguns autores detectam um aumento na produção de citocinas,⁽⁷⁹⁾ outros têm descrito resultados opostos.⁽⁸⁰⁾

Apesar dos dados experimentais demonstrando resposta inflamatória exacerbada em animais idosos após estímulo infeccioso, a hipótese prevalente é a de que pacientes idosos são imunodeprimidos, mesmo em outros quadros clínicos, quando comparados com indivíduos jovens.

Doença com amplo espectro de cursos clínicos, a PA possui formas leves e graves, com alto índice de morbidade e mortalidade. A PA grave é caracterizada por necrose pancreática e peripancreática e também por complicações locais e sistêmicas, podendo causar insuficiência de múltiplos órgãos.⁽⁸¹⁾ A razão para uma maior mortalidade e severidade da PA em indivíduos idosos, entretanto, permanece obscura.

Sabe-se que a barreira intestinal desempenha papel fundamental na PA,⁽⁷⁰⁾ pois o aumento da permeabilidade do intestino provoca maior translocação bacteriana e exacerbada resposta inflamatória, o que torna a doença mais grave e aumenta as chances de letalidade.^(82,83)

Os AMPs presentes na barreira epitelial do intestino, principalmente as α e β -defensinas e a catelicidina LL-37, contribuem para sua integridade e homeostase.^(7,84)

Tiszlavicz et al. (2010)⁽⁷¹⁾ demonstraram que o polimorfismo no número de cópias do gene da β -defensina está relacionado com a maior gravidade da PA. Neste estudo, comparou-se em diversos pacientes controles, com PA leve e grave, a incidência de um polimorfismo genético de cópias do gene da β -defensina, identificando que os pacientes com menos de quatro cópias deste gene produziam menor quantidade de β -defensina e, conseqüentemente, apresentavam PA com maior gravidade. Observou-se também que os pacientes controles apresentavam mais de quatro cópias deste gene.

Outro estudo⁽⁸⁵⁾ sugere a redução na expressão de AMPs em vários órgãos, inclusive no intestino de ratos jovens, quando comparados a ratos neonatos. Assim, levanta-se a hipótese de que ratos idosos poderiam apresentar deficiência em defensinas e na catelicidina CRAMP, explicando, assim, a maior gravidade da pancreatite aguda na população idosa.

Os resultados desta pesquisa foram surpreendentes, pois mostraram que as α -defensinas 5 e 7 estão consideravelmente aumentadas no grupo Pancreatite Idoso quando comparadas ao grupo Pancreatite Jovem. Os animais do grupo Controle Idoso apresentam expressão de α -defensinas um pouco menor do que a apresentada pelo grupo Controle Jovem, contudo essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Diversos estudos na literatura têm demonstrado a diminuição de α -defensinas 5 e 6 no ílio terminal de pacientes com a Doença de Chron, enquanto pacientes com colite apresentam diminuição de β -defensinas no cólon intestinal.⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾ Estes trabalhos propõem que a diminuição de defensinas no intestino provoca aumento da infecção por bactérias neste órgão.

Nos resultados de CRAMP, observou-se uma baixa expressão desse gene em todos os grupos estudados, não gerando, portanto, diferença significativa. Recentemente, foi publicado um estudo que corrobora os resultados encontrados nesta pesquisa, mostrando que não há diferença significativa na expressão de LL-37 em células mononucleares sanguíneas com o decorrer da idade.⁽⁵²⁾

Em trabalhos anteriores deste grupo de pesquisa, demonstrou-se que a translocação bacteriana está aumentada em ratos idosos quando comparados a ratos jovens (dados submetidos à publicação), mostrando que a PA nos idosos é mais severa do que em ratos jovens. Então, questiona-se como justificar os resultados encontrados na expressão de α -defensinas no idoso.

Verificou-se na literatura que os receptores *Toll* desempenham papel crucial na produção de defensinas no sistema gastrointestinal, como, por exemplo, o trabalho recente de Ayala-Sumano et al. (2013),⁽⁸⁹⁾ o qual demonstra que a *Entamoeba histolytica* ativa TLR2/4 e, conseqüentemente, induz a produção de β -defensina 2. Carratelli et al. (2009)⁽¹¹¹⁾ obtiveram resultados semelhantes: mostraram que *Chlamydia pneumoniae* induz TLR4, havendo, por conseguinte, produção de β -defensina 2.

Scarpa et al. (2011)⁽⁹⁰⁾ estudaram pacientes com Colite Ulcerativa submetidos à proctocolectomia que apresentavam inflamação no ílio pós-cirurgia. Neste estudo, eles obtiveram aumento na expressão gênica de α -defensina 5 e 6 e também TLR4 e sugeriram possível interação dos receptores *Toll* na produção de α -defensinas. Chalifouret et al. (2004)⁽⁹¹⁾ estudaram em cultura de células NK a ativação de TLR por PAMPs, flagelina e KpOmpA e a conseqüente produção de α -defensina 5 e IFN- γ .

Esses dados, portanto, coincidem com os obtidos anteriormente por este grupo de pesquisa, uma vez que os ratos idosos apresentam maior translocação bacteriana. Estas bactérias, quando localizadas no intestino, mais especificamente no ílio terminal, promovem a identificação dos seus PAMPs pelos TLRs, levando a maior síntese e liberação de α -defensinas neste local, a fim de diminuir e eliminar as bactérias translocadas.

Nos animais jovens, esta translocação é menor, justificando, assim, os resultados aqui encontrados. Nos grupos Controle Jovem e Controle Idoso, observou-se uma expressão muito baixa de α -defensinas, sendo mais um fator que reforça essa hipótese.

Chalifouret et al. (2004),⁽⁹¹⁾ conforme citado anteriormente, verificaram em seus experimentos que TLR promove a produção de α -defensinas e IFN- γ . Aqui, neste estudo, dosaram-se através do Milliplex algumas interleucinas e entre elas estão o IFN- γ e o IP-10, que, por sua vez, estão relacionados entre si.

IFN- γ é uma interleucina que promove a interação da imunidade inata com a imunidade adquirida. Está relacionada com a proliferação de células Th1 e inibição da via Th2; a ativação de células NK e macrófagos; a regulação dos linfócitos T e B; além de atuar promovendo a produção de IL-6, TNF- α e IL-12. Nas células epiteliais intestinais, sensibilizadas por LPS, há aumento da expressão de TLR4 e NF-kappaB.^(92,93)

Nos resultados desta pesquisa, não foram encontradas diferenças estatísticas na dosagem sérica de IFN- γ nos grupos estudados, porém ressalta-se que o grupo Pancreatite Jovem apresentou um discreto aumento em sua dosagem em relação aos demais. Estes resultados podem estar relacionados com o tempo em que foram coletadas as amostras de sangue dos animais (12 horas após a indução da pancreatite).

A quimiocina IP-10, que também foi analisada neste trabalho, é produzida a partir da liberação plasmática de IFN- γ e, conforme os resultados aqui obtidos, ela está aumentada no Grupo Pancreatite Idoso. Desta forma, se a liberação de IP-10 no plasma ocorre em decorrência da citocina IFN- γ , pode-se inferir que esta última pode ter estado aumentada nas fases iniciais da pancreatite.⁽⁹⁴⁾

Outros mediadores de suma importância na pancreatite e que podem ser induzidos pelo IFN- γ é o TNF- α e a IL-6. TNF- α é uma interleucina que pode ser produzida por várias linhagens celulares e, entre elas, podem-se citar os monócitos e macrófagos. Interage com IL-6 e com IL-1 β ,⁽⁹⁵⁾ porém sua dosagem sérica é de difícil mensuração, pois tem meia-vida plasmática curta (entre 14 e 18 minutos). Baixos níveis de TNF- α no plasma não podem ser correlacionados com a ausência de atividade inflamatória do indivíduo, devido aos fatos citados anteriormente. Estudos mostram uma elevação na dosagem de TNF- α em torno de 30 a 40% em paciente com PA.^(96,97)

Polimorfismos no gene TNF podem estar associados com suscetibilidade à PA. Estudos têm demonstrado que a terapia anti-TNF pode ser viável, pois reduziu significativamente os níveis de citocinas plasmáticas, edema pancreático e mortalidade em ratos submetidos ao modelo animal de PA. Resultados semelhantes foram observados usando anticorpos policlonais anti-TNF em ratos.⁽⁹⁸⁻¹⁰⁰⁾

Neste estudo, obteve-se um aumento significativo da expressão gênica de TNF- α no grupo Pancreatite Idoso em relação ao grupo Pancreatite Jovem, mas este resultado não foi obtido quando realizada a dosagem sérica desta citocina. O aumento de TNF- α está relacionado com a gravidade da PA, bem como da MODS.^(41,42) Estudo demonstra que há um aumento de TNF- α não apenas nas dosagens séricas e no pâncreas, mas também em órgãos distantes, como o pulmão, sendo, portanto, esperado esse aumento no intestino dos animais submetidos à PA.⁽¹⁰¹⁾ Devido à difícil mensuração dessa citocina a nível sérico, conforme

mentionado anteriormente neste estudo, a dosagem por Milliplex não encontrou resultados semelhantes aos da literatura.

IL-6 é um mediador inflamatório produzido por várias células do sistema imunológico, como, por exemplo, pelos macrófagos, monócitos e células endoteliais, em resposta a um estímulo inflamatório ou infeccioso.⁽¹⁰²⁾ Níveis elevados desta citocina são relatados em diversos estudos relacionados à PA e atribuídos a uma maior gravidade desta doença, além de fornecerem dados sobre o curso da PA.⁽¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾ Células mononucleares apresentam maior produção de IL-6 em pacientes com PA quando comparados aos controles saudáveis. Quando relacionada a pacientes com PA leve e PA grave, os níveis desta interleucina são consideravelmente maiores nos pacientes mais graves, além de um estudo já ter reportado relação de dosagens altas de IL-6 a possíveis complicações pulmonares.⁽¹⁰⁶⁾

O presente trabalho corrobora os resultados desses estudos, mostrando níveis elevados de IL-6 nos grupos Pancreatite Idoso e Jovem em comparação aos grupos Controle e Sham. No entanto, não houve diferença estatística quando comparados os grupos Pancreatite Idoso e Pancreatite Jovem.

Convém ressaltar, mais uma vez, que, neste trabalho, a coleta de sangue foi realizada após 12 horas da indução da pancreatite, sendo necessários, portanto, mais estudos em horas anteriores e posteriores à indução, a fim de se obter um panorama de como ocorre a interação das citocinas séricas em PA, bem como sua expressão intestinal.

IL-1 β , por sua vez, tem efeito sinérgico com TNF- α e também é uma citocina pró-inflamatória, sendo muito importante na pancreatite por iniciar a cascata inflamatória, ativando as células endoteliais; na migração e desgranulação dos neutrófilos; na expressão de moléculas de adesão; e na liberação de quimiocinas.^(107,108) Estudos mostram a importância desta interleucina na fase inicial da pancreatite.^(100,109) Outras pesquisas demonstram que o nível de IL-1 β está diminuído em pacientes com PA grave em comparação aos pacientes menos graves.⁽¹¹⁰⁾

Apesar do sinergismo de IL-1 β e TNF- α , relatado na literatura, não foram encontrados resultados semelhantes entre eles nesta pesquisa. Os resultados deste estudo não evidenciaram diferença estatística significativa entre os grupos estudados, o que pode estar relacionado ao período em que foram coletadas as

amostras de soro ou à gravidade da pancreatite promovida pelo modelo utilizado, que pode ter sido demasiadamente severa.

IL-10 é um mediador anti-inflamatório produzido por células Th2, monócitos e linfócitos B.⁽¹¹¹⁾ Ele diminui a liberação de citocinas pró-inflamatórias, além de reduzir a ligação de NF-kappaB com o DNA em células estimuladas com LPS.⁽¹¹²⁾ Está relacionado também com a redução da gravidade e da mortalidade em PA.^(113,114) Em humanos, foi quase indetectável a dosagem de IL-10 no grupo controle saudável, enquanto no grupo PA o nível desta citocina estava muito elevado no primeiro dia da doença, decaindo, entretanto, nos dias subsequentes.⁽¹¹⁵⁾ Em outro estudo, pacientes com PA receberam placebo com 4µkg, ou, ainda, 20 µkg, de IL-10, com diminuição da gravidade da PA no grupo que recebeu maior dosagem.⁽¹¹⁶⁾

Nos resultados aqui obtidos, verificou-se um aumento significativo na expressão gênica de IL-10 no grupo Pancreatite Jovem, se comparado ao grupo Pancreatite Idoso, comprovando, assim, que este grupo apresentava maior gravidade da PA. No entanto, constatou-se, com o ensaio de Milliplex, que o grupo Pancreatite Idoso apresentou uma elevação na dosagem de IL-10, não sendo, porém, significativo. É possível propor que, talvez, os níveis desta citocina no grupo Pancreatite Jovem estejam mais elevados em dosagens posteriores a 12 horas.⁽¹¹¹⁾

IL-18, outra citocina investigada neste estudo, também tem sido reportada em quadros clínicos graves de PA.⁽¹¹⁷⁾ É um mediador pró-inflamatório que está relacionado com o comprometimento do fígado.^(118,119) É sintetizada por monócitos, macrófagos e células epiteliais intestinais, além de estar associada aos receptores NOD e inflamassomas.⁽⁹²⁾

Outro estudo em pacientes com PA grave e leve mostra que esta interleucina pode ser detectada somente em pacientes graves e no primeiro dia de desenvolvimento da doença, não tendo sido identificada em pacientes com PA leves nos dias subsequentes ao primeiro dia. Com isso, nota-se que esta interleucina pode ser preditora da severidade da PA na fase inicial.⁽¹²⁰⁾ Os resultados obtidos com esta pesquisa não apresentam diferença estatística entre os grupos provavelmente em decorrência do período escolhido para coleta das amostras.

Investigou-se também a citocina Leptina, que é uma interleucina relacionada com a obesidade e que recentemente tem sido descrita sua relação com a barreira intestinal e com a inflamação.^(121,122) Também já foi citada sua relação com o

aumento da produção de IL-2 e de IFN- γ , promovendo o perfeito equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 e aumentando a produção de TNF- α e IL-6.^(121,122)

Esta pesquisa permitiu observar que os níveis séricos da Leptina estavam aumentados significativamente nos grupos Pancreatite, Controle e Sham Idosos em comparação aos grupos jovens. Quando se comparam estes resultados com aqueles encontrados nas citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-6, que são os mediadores descritos como relacionados com a leptina, não se encontrou nenhuma conexão entre os dados.⁽¹¹¹⁾

No entanto, é importante ressaltar, conforme visto anteriormente, que esta interleucina tem ligação com a obesidade, o que foi observado no experimento realizado para este estudo. Durante a realização do experimento, os animais idosos apresentavam visivelmente maior quantidade de tecido adiposo visceral. Isso demonstra que estes resultados significativos da leptina podem estar associados ao aumento de tecido adiposo dos animais idosos e que possivelmente não estão associados à PA.⁽¹¹¹⁾

6 CONCLUSÕES

- Observou-se maior expressão gênica das α -defensinas 5 e 7 no intestino dos ratos do grupo Pancreatite Idoso.
- Não houve diferença estatística na expressão gênica da catelicidina CRAMP entre os grupos estudados.
- Houve aumento da interleucina 6 nos grupos Pancreatite Jovem e Idoso em comparação aos grupos Controles e Sham. Entretanto, não houve diferença estatística entre jovens e idosos dos grupos Pancreatite.
- A expressão gênica de TNF- α foi significativamente maior no grupo Pancreatite Idoso em comparação aos demais. Contudo, a dosagem sérica desta interleucina não evidenciou diferença estatística entre os grupos.
- IL-10 apresentou maior expressão gênica no grupo Pancreatite Jovem em comparação ao grupo Pancreatite Idoso. Porém, a dosagem sérica não obteve o mesmo resultado.
- A dosagem sérica de IL-1 β , IFN- γ e IL-18 não revelou níveis estatisticamente significantes, o que foi atribuído ao período de coleta das amostras.
- IP-10 apresentou diferença estatística entre o grupo Pancreatite Idoso e o grupo Sham Jovem, o que permite inferir uma possível alteração de IFN- γ em períodos anteriores ao período estudado.
- A Leptina apresentou aumento nas dosagens séricas dos animais idosos, o que pode ser atribuído ao peso desses animais, que era maior do que o

registrado nos animais jovens. Todavia, não foi encontrado nenhum indício de ligação desta citocina com as demais estudadas.

REFERÊNCIAS*

1. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002;415(6870):389-95.
2. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in immunology*. 2009;30(3):131-41.
3. Pinheiro da Silva F, Machado MC. Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides*. 2012;36(2):308-14.
4. Guani-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Teran LM. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical immunology*. 2010;135(1):1-11.
5. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews Microbiology*. 2005;3(3):238-50.
6. Gallo RL, Hooper LV. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(7):503-16.
7. Muniz LR, Knosp C, Yeretssian G. Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. *Frontiers in immunology*. 2012;3:310.
8. Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*. 2006;313(5790):1126-30.
9. Wehkamp J, Schaubert J, Stange EF. Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. *Current opinion in gastroenterology*. 2007;23(1):32-8.
10. Ouellette AJ. Paneth cell alpha-defensin synthesis and function. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006;306:1-25.

*Adaptadas de: *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3.ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

11. Ghosh D, Porter E, Shen B, Lee SK, Wilk D, Drazba J, et al. Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5. *Nature immunology*. 2002;3(6):583-90.
12. Porter EM, Bevins CL, Ghosh D, Ganz T. The multifaceted Paneth cell. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2002;59(1):156-70.
13. Shirafuji Y, Tanabe H, Satchell DP, Henschen-Edman A, Wilson CL, Ouellette AJ. Structural determinants of procryptidin recognition and cleavage by matrix metalloproteinase-7. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(10):7910-9.
14. O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, et al. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *Journal of immunology*. 1999;163(12):6718-24.
15. Takahashi A, Wada A, Ogushi K, Maeda K, Kawahara T, Mawatari K, et al. Production of beta-defensin-2 by human colonic epithelial cells induced by *Salmonella enteritidis* flagella filament structural protein. *FEBS letters*. 2001;508(3):484-8.
16. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*. 1999;286(5439):525-8.
17. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Current opinion in immunology*. 2005;17(4):359-65.
18. Rohrl J, Yang D, Oppenheim JJ, Hehlhans T. Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2. *Journal of immunology*. 2010;184(12):6688-94.
19. Bulet P, Stocklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev*. 2004;198:169-84.
20. Chromek M, Slamova Z, Bergman P, Kovacs L, Podracka L, Ehren I, et al. The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection. *Nat Med*. 2006;12(6):636-41.

21. Di Nardo A, Braff MH, Taylor KR, Na C, Granstein RD, McInturff JE, et al. Cathelicidin antimicrobial peptides block dendritic cell TLR4 activation and allergic contact sensitization. *Journal of immunology*. 2007;178(3):1829-34.
22. Bals R, Weiner DJ, Moscioni AD, Meegalla RL, Wilson JM. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infection and immunity*. 1999;67(11):6084-9.
23. Kurosaka K, Chen Q, Yarovsky F, Oppenheim JJ, Yang D. Mouse cathelin-related antimicrobial peptide chemoattracts leukocytes using formyl peptide receptor-like 1/mouse formyl peptide receptor-like 2 as the receptor and acts as an immune adjuvant. *Journal of immunology*. 2005;174(10):6257-65.
24. Menard S, Forster V, Lotz M, Gutle D, Duerr CU, Gallo RL, et al. Developmental switch of intestinal antimicrobial peptide expression. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(1):183-93.
25. Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, et al. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*. 2000;96(9):3086-93.
26. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(6):397-411.
27. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010;140(6):821-32.
28. Gong J, Xu J, Zhu W, Gao X, Li N, Li J. Epithelial-specific blockade of MyD88-dependent pathway causes spontaneous small intestinal inflammation. *Clinical immunology*. 2010;136(2):245-56.
29. Cappell MS. Acute pancreatitis: etiology, clinical presentation, diagnosis, and therapy. *The Medical clinics of North America*. 2008;92(4):889-923, ix-x.
30. Carter R. Management of infected necrosis secondary to acute pancreatitis: a balanced role for minimal access techniques. *Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology*. 2003;3(2):133-8.
31. Isenmann R, Rau B, Zoellner U, Beger HG. Management of patients with extended pancreatic necrosis. *Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology*. 2001;1(1):63-8.

32. Norton ID, Clain JE. Optimising outcomes in acute pancreatitis. *Drugs*. 2001;61(11):1581-91.
33. Capurso G, Zerboni G, Signoretti M, Valente R, Stigliano S, Piciocchi M, et al. Role of the gut barrier in acute pancreatitis. *Journal of clinical gastroenterology*. 2012;46 (Supl):S46-51.
34. Elfar M, Gaber LW, Sabek O, Fischer CP, Gaber AO. The inflammatory cascade in acute pancreatitis: relevance to clinical disease. *The Surgical clinics of North America*. 2007;87(6):1325-40, vii.
35. Saluja AK, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Frossard JL, Steer ML. Secretagogue-induced digestive enzyme activation and cell injury in rat pancreatic acini. *The American journal of physiology*. 1999;276(4 Pt 1):G835-42.
36. Bassi C, Butturini G, Falconi M, Salvia R, Frigerio I, Pederzoli P. Outcome of open necrosectomy in acute pancreatitis. *Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology*. 2003;3(2):128-32.
37. Beger HG, Rau B, Mayer J, Pralle U. Natural course of acute pancreatitis. *World journal of surgery*. 1997;21(2):130-5.
38. Coelho AM, Machado MC, Cunha JE, Sampietre SN, Abdo EE. Influence of pancreatic enzyme content on experimental acute pancreatitis. *Pancreas*. 2003;26(3):230-4.
39. Sun B, Li HL, Gao Y, Xu J, Jiang HC. Factors predisposing to severe acute pancreatitis: evaluation and prevention. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2003;9(5):1102-5.
40. Zhang XP, Zhang J, Song QL, Chen HQ. Mechanism of acute pancreatitis complicated with injury of intestinal mucosa barrier. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2007;8(12):888-95.
41. Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *The Journal of pathology*. 2000;190(2):117-25.

42. Bhatia M, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis. *Current opinion in investigational drugs*. 2001;2(4):496-501.
43. Coelho AM, Machado MC, Sampietre SN, Leite KR, Oliveira VL, Pinotti HW. Hepatic damage during acute pancreatitis in the rat. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 1997;30(8):947-53.
44. Sakorafas GH, Tsiotou AG. Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis: current concepts. *Journal of clinical gastroenterology*. 2000;30(4):343-56.
45. Makhija R, Kingsnorth AN. Cytokine storm in acute pancreatitis. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*. 2002;9(4):401-10.
46. Jancar S, Abdo EE, Sampietre SN, Kwasniewski FH, Coelho AM, Bonizzia A, et al. Effect of PAF antagonists on cerulein-induced pancreatitis. *Journal of lipid mediators and cell signalling*. 1995;11(1):41-9.
47. Riche FC, Cholley BP, Laisne MJ, Vicaut E, Panis YH, Lajeunie EJ, et al. Inflammatory cytokines, C reactive protein, and procalcitonin as early predictors of necrosis infection in acute necrotizing pancreatitis. *Surgery*. 2003;133(3):257-62.
48. Choudhry MA, Fazal N, Namak SY, Haque F, Ravindranath T, Sayeed MM. PGE2 suppresses intestinal T cell function in thermal injury: a cause of enhanced bacterial translocation. *Shock*. 2001;16(3):183-8.
49. Fukushima R, Alexander JW, Wu JZ, Mao JX, Szczur K, Stephens AM, et al. Time course of production of cytokines and prostaglandin E2 by macrophages isolated after thermal injury and bacterial translocation. *Circulatory shock*. 1994;42(3):154-62.
50. Pooran N, Indaram A, Singh P, Bank S. Cytokines (IL-6, IL-8, TNF): early and reliable predictors of severe acute pancreatitis. *Journal of clinical gastroenterology*. 2003;37(3):263-6.
51. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;908:244-54.

52. Castaneda-Delgado JE, Miranda-Castro NY, Gonzalez-Amaro R, Gonzalez-Curiel I, Montoya-Rosales A, Rivas-Calderon B, et al. Production of antimicrobial peptides is preserved in aging. *Clinical immunology*. 2013;148(2):198-205.
53. Candore G, Caruso C, Jirillo E, Magrone T, Vasto S. Low grade inflammation as a common pathogenetic denominator in age-related diseases: novel drug targets for anti-ageing strategies and successful ageing achievement. *Current pharmaceutical design*. 2010;16(6):584-96.
54. Cevenini E, Caruso C, Candore G, Capri M, Nuzzo D, Duro G, et al. Age-related inflammation: the contribution of different organs, tissues and systems. How to face it for therapeutic approaches. *Current pharmaceutical design*. 2010;16(6):609-18.
55. Vasto S, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, et al. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. Mechanisms of ageing and development. 2007;128(1):83-91.
56. Vasto S, Carruba G, Lio D, Colonna-Romano G, Di Bona D, Candore G, et al. Inflammation, ageing and cancer. *Mechanisms of ageing and development*. 2009;130(1-2):40-5.
57. Tateda K, Matsumoto T, Miyazaki S, Yamaguchi K. Lipopolysaccharide-induced lethality and cytokine production in aged mice. *Infection and immunity*. 1996;64(3):769-74.
58. Turnbull IR, Wlzonek JJ, Osborne D, Hotchkiss RS, Coopersmith CM, Buchman TG. Effects of age on mortality and antibiotic efficacy in cecal ligation and puncture. *Shock*. 2003;19(4):310-3.
59. Gardner ID. The effect of aging on susceptibility to infection. *Reviews of infectious diseases*. 1980;2(5):801-10.
60. Almanzar G, Schwaiger S, Jenewein B, Keller M, Herndler-Brandstetter D, Wurzner R, et al. Long-term cytomegalovirus infection leads to significant changes in the composition of the CD8+ T-cell repertoire, which may be the basis for an imbalance in the cytokine production profile in elderly persons. *Journal of virology*. 2005;79(6):3675-83.

61. Schmaltz HN, Fried LP, Xue QL, Walston J, Leng SX, Semba RD. Chronic cytomegalovirus infection and inflammation are associated with prevalent frailty in community-dwelling older women. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2005;53(5):747-54.
62. White JC, Nelson S, Winkelstein JA, Booth FV, Jakab GJ. Impairment of antibacterial defense mechanisms of the lung by extrapulmonary infection. *The Journal of infectious diseases*. 1986;153(2):202-8.
63. Mason CM, Dobard E, Summer WR, Nelson S. Intraportal lipopolysaccharide suppresses pulmonary antibacterial defense mechanisms. *The Journal of infectious diseases*. 1997;176(5):1293-302.
64. Bradley SF, Vibhagool A, Kunkel SL, Kauffman CA. Monokine secretion in aging and protein malnutrition. *Journal of leukocyte biology*. 1989;45(6):510-4.
65. Bruley-Rosset M, Vergnon I. Interleukin-1 synthesis and activity in aged mice. *Mechanisms of ageing and development*. 1984;24(3):247-64.
66. Ershler WB, Sun WH, Binkley N, Gravenstein S, Volk MJ, Kamoske G, et al. Interleukin-6 and aging: blood levels and mononuclear cell production increase with advancing age and in vitro production is modifiable by dietary restriction. *Lymphokine and cytokine research*. 1993;12(4):225-30.
67. Fagiolo U, Cossarizza A, Scala E, Fanales-Belasio E, Ortolani C, Cozzi E, et al. Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *European journal of immunology*. 1993;23(9):2375-8.
68. Kale S, Yende S, Kong L, Perkins A, Kellum JA, Newman AB, et al. The effects of age on inflammatory and coagulation-fibrinolysis response in patients hospitalized for pneumonia. *PloS one*. 2010;5(11):13852.
69. Kelly E, MacRedmond RE, Cullen G, Greene CM, McElvaney NG, O'Neill SJ. Community-acquired pneumonia in older patients: does age influence systemic cytokine levels in community-acquired pneumonia? *Respirology*. 2009;14(2):210-6.
70. Fu S, Stanek A, Mueller CM, Brown NA, Huan C, Bluth MH, et al. Acute pancreatitis in aging animals: loss of pancreatitis-associated protein protection? *World journal of gastroenterology: WJG*. 2012;18(26):3379-88.

71. Tiszlavicz Z, Szabolcs A, Takacs T, Farkas G, Kovacs-Nagy R, Szantai E, et al. Polymorphisms of beta defensins are associated with the risk of severe acute pancreatitis. *Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology*. 2010;10(4):483-90.
72. Bruunsgaard H, Pedersen M, Pedersen BK. Aging and proinflammatory cytokines. *Current opinion in hematology*. 2001;8(3):131-6.
73. Haynes L, Maue AC. Effects of aging on T cell function. *Current opinion in immunology*. 2009;21(4):414-7.
74. Maue AC, Haynes L. CD4+ T cells and immunosenescence--a mini-review. *Gerontology*. 2009;55(5):491-5.
75. Maue AC, Yager EJ, Swain SL, Woodland DL, Blackman MA, Haynes L. T-cell immunosenescence: lessons learned from mouse models of aging. *Trends in immunology*. 2009;30(7):301-5.
76. Pawelec G, Solana R, Remarque E, Mariani E. Impact of aging on innate immunity. *Journal of leukocyte biology*. 1998;64(6):703-12.
77. Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. *Current opinion in immunology*. 2010;22(4):507-13.
78. Panda A, Arjona A, Sapey E, Bai F, Fikrig E, Montgomery RR, et al. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends in immunology*. 2009;30(7):325-33.
79. Han D, Hosokawa T, Aoike A, Kawai K. Age-related enhancement of tumor necrosis factor (TNF) production in mice. *Mechanisms of ageing and development*. 1995;84(1):39-54.
80. Effros RB, Svoboda K, Walford RL. Influence of age and caloric restriction on macrophage IL-6 and TNF production. *Lymphokine and cytokine research*. 1991;10(5):347-51.
81. Fan ST, Choi TK, Lai CS, Wong J. Influence of age on the mortality from acute pancreatitis. *The British journal of surgery*. 1988;75(5):463-6.

82. Ammori BJ, Leeder PC, King RF, Barclay GR, Martin IG, Larvin M, et al. Early increase in intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis: correlation with endotoxemia, organ failure, and mortality. *Journal of gastrointestinal surgery: official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 1999;3(3):252-62.
83. Beger HG, Bittner R, Block S, Buchler M. Bacterial contamination of pancreatic necrosis. A prospective clinical study. *Gastroenterology*. 1986;91(2):433-8.
84. Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Shinzeki M, Sawa H, Nakajima T, et al. Breakdown of intestinal mucosa via accelerated apoptosis increases intestinal permeability in experimental severe acute pancreatitis. *The Journal of surgical research*. 2006;135(1):18-26.
85. Gallo RL, Kim KJ, Bernfield M, Kozak CA, Zanetti M, Merluzzi L, et al. Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(20):13088-93.
86. Fellermann K, Wehkamp J, Herrlinger KR, Stange EF. Crohn's disease: a defensin deficiency syndrome? *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2003;15(6):627-34.
87. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, et al. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(50):18129-34.
88. Wehkamp J, Schmid M, Fellermann K, Stange EF. Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease. *Journal of leukocyte biology*. 2005;77(4):460-5.
89. Ayala-Summano JT, Tellez-Lopez VM, Dominguez-Robles Mdel C, Shibayama-Salas M, Meza I. Toll-like receptor signaling activation by *Entamoeba histolytica* induces beta defensin 2 in human colonic epithelial cells: its possible role as an element of the innate immune response. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(2):2083.

90. Scarpa M, Grillo A, Brun P, Castoro C, Pozza A, et al. Innate immune environment in ileal pouch mucosa: alpha5 defensin up-regulation as predictor of chronic/relapsing pouchitis. *Journal of gastrointestinal surgery: official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2012;16(1):188-201; discussion -2.
91. Chalifour A, Jeannin P, Gauchat JF, Blaecke A, Malissard M, N'Guyen T, et al. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood*. 2004;104(6):1778-83.
92. Meng H, Gong J, Fang L, Song Z, Wu F, Zhou B, et al. Effect of interferon-gamma on NF-kappaB and cytokine IL-18 and IL-27 in acute pancreatitis. *Bosnian journal of basic medical sciences/Udruzenje basicnih medicinskih znanosti - Association of Basic Medical Sciences*. 2013;13(2):114-8.
93. Zhao J, Kong HJ, Li H, Huang B, Yang M, Zhu C, et al. IRF-8/interferon (IFN) consensus sequence-binding protein is involved in Toll-like receptor (TLR) signaling and contributes to the cross-talk between TLR and IFN-gamma signaling pathways. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(15):10073-80.
94. Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *Journal of immunology*. 2002;168(7):3195-204.
95. Lane JS, Todd KE, Gloor B, Chandler CF, Kau AW, Ashley SW, et al. Platelet activating factor antagonism reduces the systemic inflammatory response in a murine model of acute pancreatitis. *The Journal of surgical research*. 2001;99(2):365-70.
96. Brivet FG, Emilie D, Galanaud P. Pro-and anti-inflammatory cytokines during acute severe pancreatitis: an early and sustained response, although unpredictable of death. *Parisian Study Group on Acute Pancreatitis. Critical care medicine*. 1999;27(4):749-55.
97. De Beaux AC, Fearon KC. Circulating endotoxin, tumour necrosis factor-alpha, and their natural antagonists in the pathophysiology of acute pancreatitis. *Scandinavian journal of gastroenterology Supplement*. 1996;219:43-6.
98. Grewal HP, Mohey el Din A, Gaber L, Kotb M, Gaber AO. Amelioration of the physiologic and biochemical changes of acute pancreatitis using an anti-TNF-alpha polyclonal antibody. *American journal of surgery*. 1994;167(1):214-8; discussion 8-9.

99. Hughes CB, Grewal HP, Gaber LW, Kotb M, El-din AB, Mann L, et al. Anti-TNFalpha therapy improves survival and ameliorates the pathophysiologic sequelae in acute pancreatitis in the rat. *American journal of surgery*. 1996;171(2):274-80.
100. Norman JG, Fink GW, Messina J, Carter G, Franz MG. Timing of tumor necrosis factor antagonism is critical in determining outcome in murine lethal acute pancreatitis. *Surgery*. 1996;120(3):515-21.
101. Hughes CB, Henry J, Kotb M, Lobashevsky A, Sabek O, Gaber AO. Up-regulation of TNF alpha mRNA in the rat spleen following induction of acute pancreatitis. *The Journal of surgical research*. 1995;59(6):687-93.
102. Shimada M, Andoh A, Hata K, Tasaki K, Araki Y, Fujiyama Y, et al. IL-6 secretion by human pancreatic periacinar myofibroblasts in response to inflammatory mediators. *Journal of immunology*. 2002;168(2):861-8.
103. Kingsnorth AN, Galloway SW, Formela LJ. Randomized, double-blind phase II trial of Lexipafant, a platelet-activating factor antagonist, in human acute pancreatitis. *The British journal of surgery*. 1995;82(10):1414-20.
104. Leser HG, Gross V, Scheibenbogen C, Heinisch A, Salm R, Lausen M, et al. Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 1991;101(3):782-5.
105. Viedma JA, Perez-Mateo M, Dominguez JE, Carballo F. Role of interleukin-6 in acute pancreatitis. Comparison with C-reactive protein and phospholipase A. *Gut*. 1992;33(9):1264-7.
106. Mayer J, Rau B, Gansauge F, Beger HG. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications. *Gut*. 2000;47(4):546-52.
107. Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(23):13757-65.
108. Sims JE, Giri JG, Dower SK. The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions. *Clinical immunology and immunopathology*. 1994;72(1):9-14.

109. Tanaka N, Murata A, Uda K, Toda H, Kato T, Hayashida H, et al. Interleukin-1 receptor antagonist modifies the changes in vital organs induced by acute necrotizing pancreatitis in a rat experimental model. *Critical care medicine*. 1995;23(5):901-8.
110. Powell JJ, Fearon KC, Siriwardena AK, Ross JA. Evidence against a role for polymorphisms at tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist gene loci in the regulation of disease severity in acute pancreatitis. *Surgery*. 2001;129(5):633-40.
111. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of immunology*. 1991;147(11):3815-22.
112. Clarke CJ, Hales A, Hunt A, Foxwell BM. IL-10-mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity. *European journal of immunology*. 1998;28(5):1719-26.
113. Kusske AM, Rongione AJ, Ashley SW, McFadden DW, Reber HA. Interleukin-10 prevents death in lethal necrotizing pancreatitis in mice. *Surgery*. 1996;120(2):284-8; discussion 9.
114. Rongione AJ, Kusske AM, Reber HA, Ashley SW, McFadden DW. Interleukin-10 reduces circulating levels of serum cytokines in experimental pancreatitis. *Journal of gastrointestinal surgery: official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 1997;1(2):159-65; discussion 65-6.
115. Pezzilli R, Billi P, Miniero R, Barakat B. Serum interleukin-10 in human acute pancreatitis. *Digestive diseases and sciences*. 1997;42(7):1469-72.
116. Deviere J, Le Moine O, Van Laethem JL, Eisendrath P, Ghilain A, Severs N, et al. Interleukin 10 reduces the incidence of pancreatitis after therapeutic endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Gastroenterology*. 2001;120(2):498-505.
117. Perejaslov A, Chooklin S, Bihalskyy I. Implication of interleukin 18 and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in acute pancreatitis. *Hepato-gastroenterology*. 2008;55(86-87):1806-13.
118. Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Matsumura N, Sawa H, Nakajima T, et al. Significant elevation of serum interleukin-18 levels in patients with acute pancreatitis. *Journal of gastroenterology*. 2006;41(2):158-65.

119. Yuan BS, Zhu RM, Braddock M, Zhang XH, Shi W, Zheng MH. Interleukin-18: a pro-inflammatory cytokine that plays an important role in acute pancreatitis. Expert opinion on therapeutic targets. 2007;11(10):1261-71.
120. Martin MA, Saracibar E, Santamaria A, Arranz E, Garrote JA, Almaraz A, et al. [Interleukin 18 (IL-18) and other immunological parameters as markers of severity in acute pancreatitis]. Revista española de enfermedades digestivas: organo oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva. 2008;100(12):768-73.
121. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. Journal of leukocyte biology. 2000;68(4):437-46.
122. Kruis T, Batra A, Siegmund B. Bacterial translocation - impact on the adipocyte compartment. Frontiers in immunology. 2014;4:510.

APÊNDICE

Increased intestinal production of α -defensins in aged rats with acute pancreatic injury

Débora Maria Gomes Cunha, Marcia KiyomiKoike, Denise Frediani Barbeiro,
Hermes Vieira Barbeiro, Mike YoshioHamasaki, Guilherme Tude Coelho
Neto, Marcel Cerqueira César Machado and Fabiano Pinheiro da Silva

Emergency Medicine Department, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Corresponding author

Fabiano Pinheiro da Silva, M.D., Ph.D.

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Laboratório de Emergências Clínicas (LIM-51)

Av. Dr. Arnaldo, 455 sala 3189, CEP 01246-000, São Paulo - SP, Brazil

Phone: +55.11.3061.8480

Fax: +55.11.3061.8480

E-mail: pinheirofabiano@hotmail.com

Abstract

Acute pancreatitis is a life-threatening situation, frequently associated with uncontrolled local and systemic inflammation, and aging is associated with a worst prognosis. Antimicrobial peptides are ancient molecules that belong to innate immunity and are able to trigger a myriad of effector responses. We have hypothesized that antimicrobial peptides could play an important role during serious pancreatic injury. To investigate our hypothesis, α -defensins-5, α -defensins-7 and CRAMP gene expression levels were measured in the intestinal tissue of old and young rats submitted to chemical pancreatic damage. We found significantly higher levels of α -defensin-5 and α -defensin-7, but not CRAMP, in the samples from old mice. This increase was not associated with a worst systemic inflammatory response. We conclude that α -defensins may have a pivotal role during acute pancreatitis and that the elderly develops a more severe inflammatory process.

Keywords: α -defensins, pancreatitis, rats, elderly, antimicrobial peptides, intestine

Abbreviations: AMPs, antimicrobial peptides; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor; DEFA, α -defensin; IFN, interferon; TLR, Toll-like receptors

1. Introduction

Antimicrobial peptides (AMPs) are evolutionary conserved molecules produced by vertebrates, insects, and plants. They are considered “natural antibiotics” because they directly kill invading pathogens by creating pores to disrupt their cell membranes. In addition to these antimicrobial properties

against Gram-positive and Gram-negative bacteria, protozoa, fungi, and viruses, many other functions were recently described (Guani-Guerra and others 2010; Lai and Gallo 2009; Pinheiro da Silva and Machado 2012; Zasloff 2002).

AMPs are produced mainly by epithelial cells, probably because these sites are in constant contact with the external environment and are more likely to be exposed to microbial attack (Beger and others 1997; Cappell 2008). Susceptible sites that produce AMPs include the intestinal mucosa, skin, and respiratory and reproductive tracts.

Integrity of the intestinal barrier is of critical importance for maintaining health. Diseases that alter intestinal permeability, such as sepsis or acute pancreatitis, are associated with high morbidity and mortality rates. Acute pancreatitis is a common disease in critical care and is caused by alcoholism or gallstones (Cappell 2008). The prognosis of acute pancreatitis is directly related to the intensity of inflammation. Elevated levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF α) are associated with higher mortality rates and are used in the clinical to measure the severity of inflammatory responses. A counter-regulatory anti-inflammatory response characterized by the production of mediators such as IL-10 (Bhatia and others 2000; Bhatia and others 2001; Coelho and others 1997; Sakorafas and Tsiotou 2000) is concomitantly triggered to prevent tissue damage caused by excessive inflammation.

There has been an increase in life expectancy in economically developed countries and, more recently, in less developed countries. Many studies have investigated the inflammatory profile of the elderly during inflammatory catastrophes (Pinheiro da Silva and others 2013), but it remains inconclusive whether older patients can mount an effective immune response. Patients with advanced age have increased susceptibility to postoperative infections (Franceschi and others 2000) and show an increase in overall hospital mortality. Although these events might be related to depletion of the immune system, our group observed a similar inflammatory profile when older septic patients were compared with young septic patients (Pinheiro da Silva and others 2013).

The aim of this study was to verify the local levels of intestinal antimicrobial peptides and the systemic inflammatory profile of young and old rats with acute pancreatitis.

2. Material and methods

2.1. Animals and model of acute pancreatitis

All experiments were performed at the Laboratory of Emergency Medicine (LIM-51), University of São Paulo Faculty of Medicine, Brazil.

Wistar male rats, 280–350 g, were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (75 mg/kg of body weight, Parke-Davis, São Paulo, Brazil) and xylazine (10 mg/kg of animal body weight, Bayer HealthCare, Toronto, Canada).

The animals were then divided into the following groups: Young Pancreatitis (n = 10); Young Control (n = 17); Old Pancreatitis (n = 8); Old Controls (n = 10); Young Sham (n = 5); and Old Sham (n = 4).

Acute pancreatitis was induced by injecting 2.5% taurocholic acid (Sigma Chemical Company TM, St. Louis, MO, USA) at a dose of 0.1 mL/100 g body weight. After 12 h, the terminal ileum of the intestine was collected for molecular analysis by RT-PCR. Blood was collected from the cava vein and serum was separated for Miliplex analysis.

2.2. Gene expression by RT-PCR analysis

α -Defensins-5 (DEFA5), α -defensins-7 (DEFA7), CRAMP, and TNF α mRNA levels were determined by RT-PCR. The sequences of primers used in this study are described in **Table 1**.

2.3. Miliplex analysis

TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, interferon- γ (IFN γ), IP-10, and IL-18 serum levels were measured by Miliplex Technology (Millipore, USA) and analyzed using the MAGPIX Xponent software.

2.4. Statistical analysis

Results were compared by ANOVA or the Kruskal–Wallis test, as appropriate. A p-value of < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using Graphpad Prism 5.0 for Windows.

3. Results

We performed gene expression analysis of α -defensin-7, α -defensin-5, CRAMP, and TNF α levels. α -defensins levels were significantly higher in aged animals with pancreatitis compared with all other groups ($p < 0.001$) (**Figure 1A and 1B**). The levels of CRAMP were statistically similar in the aged and young groups (**Figure 1C**). TNF α gene expression levels, a well-known marker of inflammation, were significantly higher in the terminal ileum of aged rats with acute pancreatitis than in all other groups ($p < 0.001$) (**Figure 1D**).

Interestingly, serum TNF α levels of aged and young rats were similar during the pancreatic insult (**Figure 2A**), indicating differences in inflammatory status are only observed at the local level. Furthermore, systemic IL-10 levels (**Figure 2B**), serum IL-1 β (**Figure 3A**) and IL-18 levels (**Figure 3C**) were similar in all study groups. Despite its enhanced production following pancreatic injury, serum IL-6 levels of aged animals were similar to those detected in the young group (**Figure 3B**). Aged and young animals, moreover, exhibited similar serum levels of IFN γ (**Figure 4A**) and IP-10 (**Figure 4B**).

4. Discussion

The molecular investigation of aging has attracted increased attention from the scientific community, because it is associated with diseases such as atherosclerosis, Alzheimer's disease, type 2 diabetes mellitus, and other major causes of death worldwide. Senescence, characterized by chronically

elevated levels of inflammatory markers such as TNF, IL-1 β , IL-6, and C-reactive protein (Bruunsgaard and others 2001), might influence various components of the immune system. Profound changes in the function of T cells, especially T regulatory and Th17 cells, were described in the elderly (Haynes and Maue 2009; Maue and Haynes 2009). Regarding innate immunity, changes caused by aging have been described in macrophages, polymorphonuclear cells, and natural killer cells (Pawelec and others 1998; Shaw and others 2010). However, discrepant results have been reported and the inflammatory status of the elderly during critical illness is under intense investigation (Panda and others 2009). While some studies reported increased proinflammatory activity in the elderly during acute stress compared with the young (Han and others 1995), others have described opposite results (Effros and others 1991).

Acute pancreatitis has mild and severe forms and the latter is notoriously associated with high mortality rates. Severe acute pancreatitis is characterized by pancreatic and peri-pancreatic necrosis and systemic complications, often leading to multiple organ failure (Fan and others 1988). Why older adults exhibit a higher mortality rate than the young remains unclear.

The intestinal barrier plays a key role in acute pancreatitis (Fu and others 2012), because increased gut permeability can lead to bacterial translocation and exacerbated inflammatory responses (Ammori and others 1999; Beger and others 1986). AMPs, especially α -defensins and

cathelicidin LL-37, produced by the gut epithelial barrier, might contribute to the maintenance of intestinal integrity (Yasuda and others 2006).

Tiszlavicz et al. (Tiszlavicz and others 2010) demonstrated that variations in the copy number of the β -defensin gene were associated with increased severity of acute pancreatitis. In their study, a high number of copies of the β -defensin gene predicted a worse outcome and a study by Gallo et al. (Gallo and others 1997) showed a reduction in the expression levels of CRAMP in the intestine of young mice compared with neonatal mice, suggesting CRAMP might have a protective role in neonatal mice.

Several studies reported a reduction of α -defensin production in the terminal ileum of patients with Crohn's disease and patients with colitis exhibited decreased β -defensin production in the colon. Overall, these studies suggest that a decrease in intestinal defensin production facilitates bloodstream infection through the gut.

In the current study, we found that α -defensins-5 and 7 were considerably increased in the elderly rat group compared with the young group, during acute pancreatitis. Recent experiments from our group demonstrated that bacterial translocation was increased in aged rats compared with young rats (*manuscript in preparation*), and that acute pancreatitis was more severe in elderly than in young animals.

Previous studies demonstrated Toll-like receptors (TLRs) play a crucial role in the production of defensins in the gastrointestinal system. A recent study by Ayala-Summano et al. (Ayala-Summano and others

2013) demonstrated that *Entamoeba histolytica* activated TLRs2 and 4, inducing the potent production of β -defensin-2. Rizzo et al. also showed that *Chlamydia pneumoniae* induced TLR4 activation and subsequent β -defensin-2 production (Rizzo and others 2008). Scarpa and colleagues studied patients with ulcerative colitis and showed increased α -defensin 5 and 6 gene expression after surgical procedures (Scarpa and others 2012). Chalifour et al. demonstrated natural killer cells activated by TLR agonists produced excessive levels of α -defensin-5 and IFN γ (Chalifour and others 2004).

We propose that older rats have defective intestinal integrity and that during acute pancreatitis there is enhanced bacterial translocation, which triggers a greater production of α -defensins by Paneth cells, the major source of intestinal AMPs. TLR receptors activated by danger signals and bacteria can stimulate antimicrobial peptide synthesis and release.

The significant increase in TNF α gene expression in aged animals confirmed that aged rats developed more severe local inflammation compared with young rats. Interestingly, a study by Hughes et al. demonstrated an increase in TNF α levels in both the abdominal compartment and in distant organs, such as the lung (Hughes and others 1995).

5. Conclusion

The mechanisms underlying the increased severity of acute pancreatitis in the elderly are complex. Here, we showed that aged rats exhibited increased intestinal production of α -defensins compared with young

rats. This was associated with exacerbated bacterial translocation that might affect the elderly. Antimicrobial peptide release, moreover, might further increase inflammatory processes, because they activate many immune pathways, creating a vicious deleterious circle. Although antimicrobial peptides are very effective alarmins, they might also aggravate local injury. Therefore, further studies are warranted to investigate the multiple effects that antimicrobial peptides might exert on the inflammatory course of acute pancreatitis.

Acknowledgments

FPS is supported by FAPESP, Sao Paulo Research Foundation (Grant No. 2009/17731-2) and CNPq, The National Council for Scientific and Technological Development (Grant No. 470539/2013-15).

Conflicts of interest

The authors declare that they have no financial or ethical conflicts of interest.

Figure Legends

Figure 1. Gene expression of α -defensin-5 (A), α -defensin-7 (B), CRAMP (C), and TNF- α (D) in the distal ileum of rats.

Figure 2. Determination of TNF- α (A) and IL-10 (B) serum levels.

Figure 3. Determination of IL-1 β (A), IL-6 (B) and IL-18 (C) serum levels.

Figure 4. Determination of IFN γ (A) and IP-10 (B) serum levels.

Table 1. Sequence of primers used in this study.

References

Ammori, B.J.; Leeder, P.C.; King, R.F.; Barclay, G.R.; Martin, I.G.; Larvin, M.; McMahon, M.J. Early increase in intestinal permeability in patients

- with severe acute pancreatitis: correlation with endotoxemia, organ failure, and mortality. *J Gastrointest Surg.* 3:252-262; 1999
- Ayala-Summano, J.T.; Tellez-Lopez, V.M.; Dominguez-Robles Mdel, C.; Shibayama-Salas, M.; Meza, I. Toll-like receptor signaling activation by *Entamoeba histolytica* induces beta defensin 2 in human colonic epithelial cells: its possible role as an element of the innate immune response. *PLoS Negl Trop Dis.* 7:e2083; 2013
- Beger, H.G.; Bittner, R.; Block, S.; Buchler, M. Bacterial contamination of pancreatic necrosis. A prospective clinical study. *Gastroenterology.* 91:433-438; 1986
- Beger, H.G.; Rau, B.; Mayer, J.; Pralle, U. Natural course of acute pancreatitis. *World J Surg.* 21:130-135; 1997
- Bhatia, M.; Brady, M.; Shokuhi, S.; Christmas, S.; Neoptolemos, J.P.; Slavin, J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol.* 190:117-125; 2000
- Bhatia, M.; Neoptolemos, J.P.; Slavin, J. Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis. *Curr Opin Investig Drugs.* 2:496-501; 2001
- Bruunsgaard, H.; Pedersen, M.; Pedersen, B.K. Aging and proinflammatory cytokines. *Curr Opin Hematol.* 8:131-136; 2001
- Cappell, M.S. Acute pancreatitis: etiology, clinical presentation, diagnosis, and therapy. *Med Clin North Am.* 92:889-923, ix-x; 2008
- Chalifour, A.; Jeannin, P.; Gauchat, J.F.; Blaecke, A.; Malissard, M.; N'Guyen, T.; Thieblemont, N.; Delneste, Y. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood.* 104:1778-1783; 2004
- Coelho, A.M.; Machado, M.C.; Sampietre, S.N.; Leite, K.R.; Oliveira, V.L.; Pinotti, H.W. Hepatic damage during acute pancreatitis in the rat. *Braz J Med Biol Res.* 30:947-953; 1997
- Effros, R.B.; Svoboda, K.; Walford, R.L. Influence of age and caloric restriction on macrophage IL-6 and TNF production. *Lymphokine Cytokine Res.* 10:347-351; 1991
- Fan, S.T.; Choi, T.K.; Lai, C.S.; Wong, J. Influence of age on the mortality from acute pancreatitis. *Br J Surg.* 75:463-466; 1988
- Franceschi, C.; Bonafe, M.; Valensin, S.; Olivieri, F.; De Luca, M.; Ottaviani, E.; De Benedictis, G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 908:244-254; 2000
- Fu, S.; Stanek, A.; Mueller, C.M.; Brown, N.A.; Huan, C.; Bluth, M.H.; Zenilman, M.E. Acute pancreatitis in aging animals: loss of pancreatitis-associated protein protection? *World J Gastroenterol.* 18:3379-3388; 2012
- Gallo, R.L.; Kim, K.J.; Bernfield, M.; Kozak, C.A.; Zanetti, M.; Merluzzi, L.; Gennaro, R. Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. *J Biol Chem.* 272:13088-13093; 1997
- Guani-Guerra, E.; Santos-Mendoza, T.; Lugo-Reyes, S.O.; Teran, L.M. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol.* 135:1-11; 2010

- Han, D.; Hosokawa, T.; Aoike, A.; Kawai, K. Age-related enhancement of tumor necrosis factor (TNF) production in mice. *Mech Ageing Dev.* 84:39-54; 1995
- Haynes, L.; Maue, A.C. Effects of aging on T cell function. *Curr Opin Immunol.* 21:414-417; 2009
- Hughes, C.B.; Henry, J.; Kotb, M.; Lobaschevsky, A.; Sabek, O.; Gaber, A.O. Up-regulation of TNF alpha mRNA in the rat spleen following induction of acute pancreatitis. *J Surg Res.* 59:687-693; 1995
- Lai, Y.; Gallo, R.L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 30:131-141; 2009
- Maue, A.C.; Haynes, L. CD4+ T cells and immunosenescence--a mini-review. *Gerontology.* 55:491-495; 2009
- Maue, A.C.; Yager, E.J.; Swain, S.L.; Woodland, D.L.; Blackman, M.A.; Haynes, L. T-cell immunosenescence: lessons learned from mouse models of aging. *Trends Immunol.* 30:301-305; 2009
- Panda, A.; Arjona, A.; Sapey, E.; Bai, F.; Fikrig, E.; Montgomery, R.R.; Lord, J.M.; Shaw, A.C. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol.* 30:325-333; 2009
- Pawelec, G.; Solana, R.; Remarque, E.; Mariani, E. Impact of aging on innate immunity. *J Leukoc Biol.* 64:703-712; 1998
- Pinheiro da Silva, F.; Machado, M.C. Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides.* 36:308-314; 2012
- Pinheiro da Silva, F.; Zampieri, F.G.; Barbeiro, D.F.; Barbeiro, H.V.; Goulart, A.C.; Torggler Filho, F.; Velasco, I.T.; da Cruz Neto, L.M.; de Souza, H.P.; Machado, M.C. Septic shock in older people: a prospective cohort study. *Immunity & ageing : I & A.* 10:21; 2013
- Rizzo, A.; Paolillo, R.; Buommino, E.; Lanza, A.G.; Guida, L.; Annunziata, M.; Carratelli, C.R. Modulation of cytokine and beta-defensin 2 expressions in human gingival fibroblasts infected with *Chlamydia pneumoniae*. *Int Immunopharmacol.* 8:1239-1247; 2008
- Sakorafas, G.H.; Tsiotou, A.G. Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis: current concepts. *J Clin Gastroenterol.* 30:343-356; 2000
- Scarpa, M.; Grillo, A.; Scarpa, M.; Brun, P.; Castoro, C.; Pozza, A.; Cavallo, D.; Faggian, D.; Ruffolo, C.; D'Inca, R.; Bardini, R.; Castagliuolo, I.; Angriman, I. Innate immune environment in ileal pouch mucosa: alpha5 defensin up-regulation as predictor of chronic/relapsing pouchitis. *J Gastrointest Surg.* 16:188-201; discussion 201-182; 2012
- Shaw, A.C.; Joshi, S.; Greenwood, H.; Panda, A.; Lord, J.M. Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol.* 22:507-513; 2010
- Tiszlavicz, Z.; Szabolcs, A.; Takacs, T.; Farkas, G.; Kovacs-Nagy, R.; Szantai, E.; Sasvari-Szekely, M.; Mandi, Y. Polymorphisms of beta defensins are associated with the risk of severe acute pancreatitis. *Pancreatology.* 10:483-490; 2010
- Yasuda, T.; Takeyama, Y.; Ueda, T.; Shinzeki, M.; Sawa, H.; Nakajima, T.; Kuroda, Y. Breakdown of intestinal mucosa via accelerated apoptosis increases intestinal permeability in experimental severe acute pancreatitis. *J Surg Res.* 135:18-26; 2006

Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*.
415:389-395; 2002

FIGURE 1

FIGURE 2

FIGURE 4

TABLE 1

GEN	PRIMERS	ANNEALING (°C)	CYCLES
DEFA7	sense: ATGAGGACGCTCACTCTG CT anti-sense: ATCCCCTCCAAAGGATATGG	60°C	40
DEFA5	sense: GGACGCTCACTCTGCTTA CC anti-sense: TCTTGAGAGCAGTGCCTTT	60°C	40
CRAMP	sense: AAGTATGTGAGGTTCCGAGTG AA anti-sense: ArCCAAACTTCTCTCCACCTTTTC	60°C	38
TNF α	sense: ACTCCCAGAAAAGCAAGCAA anti-sense: CGAGCAGGAATGAGAAGAGG	60°C	40
IL-10	sense: GAATTCCTGGGAGAGAAGC anti-sense: CGGGTGGTTCAATTTTC AT	60°C	40
Housekeeping GAPDH	sense: ATGATT CTA CCCACGGCAAG anti-sense: CTGGAAGATGGTGATGGGTT	60°C	40