UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

Rízia Callou Amaral

Diminuição dos níveis de quimiocinas no tecido cardíaco de ratos idosos submetidos ao modelo de pancreatite aguda grave: um novo mecanismo cardioprotetor durante a inflamação sistêmica

São Paulo
2016

Rízia Callou Amaral

Diminuição dos níveis de quimiocinas no tecido cardíaco de ratos idosos submetidos ao modelo de pancreatite aguda grave: um novo mecanismo cardioprotetor durante a inflamação sistêmica

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
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Amaral, Rízia Callou
Diminuição dos níveis de quimiocinas no tecido cardíaco de ratos idosos submetidos ao modelo de pancreatite aguda grave : um novo mecanismo cardioprotetor durante a inflamação sistêmica / Rízia Callou Amaral. -- São Paulo, 2016.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

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

Descritores: 1.Pancreatite necrosante aguda 2.Inflamação 3.Quimiotaxia 4.Citocinas 5.Ratos 6.Coração

USP/FM/DBD-162/16

À minha amada família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de ter cursado e concluído esse mestrado, se não fosse por Ele, certamente não teria chegado até aqui.

Agradeço a minha mãe e ao meu pai, Neuma Callou e Francisco Amaral por todo amor, apoio, educação, dedicação e incentivo que me deram ao longo de toda a minha vida. Sem duvida vocês são as minhas maiores referências em relação aos verdadeiros valores que constituem um ser humano íntegro e digno. Essa conquista não é somente minha, mas de todos nós.

As minhas amadas e admiráveis irmãs Bruna, Dalila e Talita, por todo o amor, incentivo, oração e paciência que tiveram comigo, mesmo naquelas horas em que não pude gastar tempo suficiente com vocês, porque estava estudando. Mas, estão vendo? Valeu a pena! E a mais nova caçulinha Marjorie, que veio para nos encher ainda mais de alegria. Aos meus queridos sobrinhos Julia, André e Pedro, pelo carinho e amor, e nossas divertidas brincadeiras, vocês são meus maiores presentes.

As minhas amigas, parceiras e irmãs Aline Butti, Aline Leite e Pamella Man, por todos os conselhos, por se alegrarem com minhas conquistas e também chorarem comigo nas horas mais difíceis, por cada oração, cada palavra de carinho e cada tempo que passamos juntas.

Agradeço a toda à equipe do Lim 51, especialmente a Dra. Marcia Koike, a Dra. Denise F. Barbeiro, a Suely K. Ariga, o Dr. Hermes Barbeiro e ao Prof. Marcel Cerqueira Cesar Machado, que foram fundamentais para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho. Agradeço ainda, aos meus amigos do laboratório, em especial a Débora Gomes, ao Guilherme Tude e ao Mike Yoshio, por toda paciência e disposição em me ajudar com os experimentos, além de todos os valiosíssimos conselhos e sugestões.

Agradeço ao Dr. Charles Mady, pela parceria e apoio desse projeto. A Dra. Viviane T. Hotta por ter me apresentado com tanto empenho e paciência o “mundo maravilhoso” da ecocardiografia. Passei a ser completamente apaixonada por esse órgão tão incrível que é o coração. Muito obrigada também aos meus queridos colegas Fernanda Pessoa, Keila Fonseca e Orlando Ribeiro, vocês são profissionais e pessoas incríveis, sempre dispostos a ajudarem.

Agradeço a Faculdade de Medicina da USP, por ter me recebido tão bem e por ter fornecido ferramentas essenciais, além de profissionais excelentes que contribuíram significativamente para a conclusão desse trabalho. Agradeço ainda, a CAPES por ter acreditado nesse projeto e ter fornecido todo o suporte financeiro necessário.

Por último, mas não menos importante, meu imenso agradecimento ao meu orientador Dr. Fabiano Pinheiro da Silva, que acreditou em mim, quando talvez nem mesmo eu acreditasse. Nunca me esqueço do dia em que ele sentou-se comigo e me deu uma aula de imunologia básica, logo quando cheguei, ele poderia ter simplesmente indicado um bom livro ou artigo para que eu pudesse me aprofundar mais no assunto, mas não, ele fez questão de me ensinar assim como um mestre faz, daquele dia em diante tive a certeza que seria muito bem acolhida e orientada. Então, mais uma vez o meu muito obrigada, pela oportunidade que me deu, pela paciência, por seus ensinamentos, pelas broncas e “puxões de orelha”, mas também por sempre me ouvir. Tudo isso foi extremamente essencial para me tornar uma aluna, pesquisadora e pessoa melhor.

"Devemos alegrar-nos nas dificuldades, pois as dificuldades produzem a paciência, e a paciência a experiência, e a experiência a esperança. Essa esperança não nos deixa decepcionados, pois Deus derramou o seu amor no nosso coração, por meio do Espírito Santo, que ele nos deu. "

Romanos 5:3-5

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais causas da Pancreatite Aguda.....22

Figura 2 – Papel das citocinas e células inflamatórias na Pancreatite Aguda.....26

Figura 3 – Mecanismos da resposta imune inata e adaptativa desenvolvidos na PA.....30

Figura 4 – Citocinas envolvidas na insuficiência cardíaca congestiva.....32

Figura 5 – Expressão de C5 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.....45

Figura 6 – Expressão de CCL1 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.....45

Figura 7 – Expressão de CCL11 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.....46

Figura 8 – Expressão de CCL19 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.....47

Figura 9 – Expressão de CCL20 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.....47

Figura 10 – Expressão de CCL7 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.....48

Figura 11 – Expressão de CXCL1 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.....49

Figura 12 – Expressão de CXCL3 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.....49

Figura 13 – Expressão de IL-10 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.....50

Figura 14 – Expressão de IL-6 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.....51

Figura 15 – Expressão de TNF no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.....51

Figura 16 – Expressão de TNFRSF11b no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.....52

Figura 17 – Expressão de TGFB2 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.....52

Figura 18 – Expressão de CSF2 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.....53

Figura 19 – Infiltração de neutrófilos no tecido cardíaco de ratos controles e com pancreatite.....54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estratificação da gravidade da PA, de acordo com a classificação de Atlanta.....21

Tabela 2 – Principais mediadores inflamatórios na PA.....25

Tabela 3 – Citocinas analisadas através do PCR Array.....42

Tabela 4 – Média do número de neutrófilos encontrados no tecido cardíaco.....54

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

APACHE II	*Acute Physiology and Cronic Health Care Evaluation II*
B2m	Beta-2-Microglobulina
C5	Componente 5 do sistema complemento
CARS	Síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória
CCL1	Ligante de quimiocina 1 (C-C motif)
CCl2	Ligante de quimiocina 2 (C-C motif)
CCL7	Ligante de quimiocina 7 (C-C motif)
CCL11	Ligante de quimiocina 11 (C-C motif)
CCL19	Ligante de quimiocina 19 (C-C motif)
CCL20	Ligante de quimiocina 20 (C-C motif)
CSF2	Fator estimulante de colônias
CXCL1	Ligante de quimiocina 1 (C-X-C motif)
CXCL3	Ligante de quimiocina 3 (C-X-C motif)
CXCL10	Ligante de quimiocina 10 (C-X-C motif)
DEPC:	Dietil pirocarbonato
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
Gpbar1	Proteína G
HAPS	*Harmless Acute Pancreatitis Score*
IFN-γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
IL-1b	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1

MIF	Fator Inibitório da Migração de Macrófagos
MODS	Síndrome de disfunção múltipla de órgãos
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	Células *Natural killer*
NK T	Células *Natural killer* T
PA	Pancreatite aguda
PAF	Fator ativador plaquetário
PF4	Fator plaquetário 4
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
RNAm	RNA mensageiro
Rplp1	Proteína Ribossomal P1
RT-PCR	Reação de cadeia polimerase transcriptase reversa
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
T $CD4^+$	Linfócito T $CD4^+$
T $CD8^+$	Linfócito T $CD8^+$
TGFB2	Fator de crescimento transformante-beta1
Th1	Células T auxiliares do tipo 1
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFRSF11b	Super família do receptor do fator de necrose tumoral 11 b

RESUMO

Amaral, RC. Diminuição dos níveis de quimiocinas no tecido cardíaco de ratos idosos submetidos ao modelo de pancreatite aguda grave: um novo mecanismo cardioprotetor durante a inflamação sistêmica [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

A pancreatite aguda (PA) é uma doença que frequentemente está associada a uma inflamação local e sistêmica não controlada que é responsável pela alta morbidade e mortalidade desta doença. Independentemente do mecanismo inicial, o processo inflamatório ocorre após uma lesão nas células acinares, levando ao recrutamento de células inflamatórias que produzem citocinas e quimiocinas que são capazes de desempenhar um papel importante na patogênese dessa doença. A inflamação pancreática induz distúrbios profundos na homeostase levando ao dano tecidual em outros órgãos, tais como o intestino e o pulmão. Por outro lado, órgãos como o cérebro têm mecanismos estruturais e celulares de proteção contra a inflamação. Tem sido descrito, que pacientes com insuficiência cardíaca apresentam lesão cardíaca, levando a produção de citocinas pró-inflamatórias, ativação de células T e do sistema complemento. Além da cascata inflamatória, durante todo o estágio da PA o sistema cardiovascular pode sofrer alterações cardíacas e histológicas compatíveis com o processo inflamatório desencadeado pela PA. A intensidade da inflamação sistêmica devido à PA é semelhante em ratos jovens e idosos, porém, a duração da inflamação sistêmica parece ser muito maior nos idosos. A idade avançada é considerada um fator prognóstico independente para um pior prognóstico na PA, mas os mecanismos envolvidos não são totalmente compreendidos. Decidimos analisar a expressão gênica de diversas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no coração de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de PA, com o objetivo de investigar os efeitos da inflamação sistêmica no coração e determinar se esses efeitos sofrem algum tipo de modificação durante a senilidade. Ratos jovens e idosos foram submetidos à PA utilizando-se ácido taurocólico 2,5% e, após 11 horas, o tecido cardíaco foi coletado para histologia e para a extração de RNA. A determinação do RNAm de citocinas e quimiocinas foi feita através do PCR Array. Como resultado, a expressão das interleucinas IL-6 E IL-10, e as quimiocinas CCL7 e CCL19 nos ratos idosos com PA foi menor do que nos ratos jovens com PA. Entretanto, os níveis de CXCL3 e CCL20 aumentaram nos idosos com PA. A expressão de CCL20 e CCL19 foi significativamente alta em ambos os grupos jovens e idosos com PA quando comparados com seus respectivos controles. Nos idosos com PA houve uma redução na expressão de CXCL1, CCL1, CCL11 e IL-10 comparados com seus controles, já entre os grupos saudáveis os idosos expressaram mais do que os jovens. Na análise histológica, a infiltração dos neutrófilos foi significativamente maior no tecido cardíaco dos ratos jovens e idosos com PA, comparado com seus controles. Esse estudo indica que a inflamação sistêmica pode mostrar características únicas para diferentes órgãos do corpo, e a diminuição da expressão gênica de algumas quimiocinas no tecido cardíaco de ratos mais velhos com PA pode sugerir um possível mecanismo cardioprotetor em animais mais velhos.

Descritores: pancreatite aguda; inflamação; quimiotaxia; citocinas; senilidade; coração.

ABSTRACT

Amaral, RC. Decreased gene expression of chemokines in the heart tissue of aged rats subjected to model of severe acute pancreatitis: a new mechanism of heart protection during systemic inflammation [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Acute pancreatitis (AP) is a disease frequently associated with uncontrolled local and systemic inflammation that is responsible for the morbidity and mortality of this disease. Regardless of the initial mechanism, the inflammatory process is triggered by injury to the pancreatic acinar cells, leading to recruitment of inflammatory cell that produce cytokines and chemokines, which play an important role in the pathogenesis of this disease. Pancreatic inflammation induces profound disturbances in homeostasis, leading to tissue injury in other organs such as the intestine and lung. On the other hand, organs such as the brain have structural and cellular mechanisms of protection against inflammation. It has been described that patients with heart failure exhibit cardiac injury, leading to the production of pro-inflammatory cytokines, activation of T cells and activation of the complement system. In addition to inflammatory cascade during all stage of the PA, the cardiovascular system may suffer cardiac and histological changes compatible with inflammatory process triggered by the AP. The intensity of systemic inflammation associated with AP is similar in young and old rats, however, the duration of systemic inflammation is much longer in older animals. Advanced age is considered to be an independent prognostic factor for a poorer prognosis in AP, but the mechanisms involved are not fully understood. We analyzed the gene expression of several cytokines, chemokines and growth factors in young and aged rats hearts in an animal model of AP to investigate the effects of systemic inflammation on the heart, and to determine whether the effects are modified with age. Young and old rats were subjected to AP using taurocholic acid (2.5%) and after 11 hours, the cardiac tissue was collected to histology and RNA extraction. The determination of mRNA of cytokines and chemokines was performed by PCR array. The expression of interleukins IL-6 and IL-10 and the chemokines CCL7 and CCL19 in the aged AP rats was lower than young AP rats. However, CXCL3 and CCL20 levels showed opposite results, with increased levels in the aged AP group. The expression of CCL20 and CCL19 was greater in both young and aged AP rats compared with their respective controls. In aged AP rats there were a reduction in the expression of CXCL1, CCL1, CCL11 and IL-10 compared to their controls, and among healthy groups, the elderly rats expressed more than the young rats. In histological analysis, the neutrophils infiltration was significantly higher in the heart tissue of AP rats, both young and old, compared with their controls. This study indicates that systemic inflammation may show unique features for different organs in the body and decreased gene expression of some chemokines in the heart tissue of older AP may suggest a possible cardioprotective mechanism in older animals.

Descriptors: acute pancreatitis; inflammation; chemotaxis; cytokines; senility; heart.

SUMÁRIO

Lista de figuras
Lista de tabelas
Lista de abreviaturas, símbolos e siglas
Resumo
Abstract

1 INTRODUÇÃO 17
1.1 Definição e classificação da Pancreatite Aguda 19
1.2 Fisiopatologia 21
1.3 O papel das citocinas e quimiocinas na patogênese da PA 24
1.3.1 Citocinas 24
1.3.2 Quimiocinas 29
1.4 Relação de citocinas e a disfunção miocárdica 31
1.5 A importância da barreira intestinal 34
1.6 Pancreatite Aguda e Senilidade 35
2 OBJETIVOS 37
2.1 Objetivos Específicos 37
3 MÉTODOS 38
3.1 Local de Realização dos Experimentos 38
3.2 Amostra 38
3.3 As Técnicas 39
3.3.1 Modelo animal de Pancreatite Aguda 39
3.3.2 Extração de RNA 39
3.3.3 Tratamento com DNase 40
3.3.4 Quantificação de RNA 40
3.3.5 Síntese de cDNA 41
3.3.6 Análise da expressão gênica – RT-PCR array 41
3.3.7 Histologia 42
3.4 Análise Estatística 43
4 RESULTADOS 44
4.1 Expressão gênica de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento 44
4.1.1 Expressão de C5 44
4.1.2 Expressão de CCL1 45
4.1.3 Expressão de CCL11 46
4.1.4 Expressão de CCL19 46

4.1.5 Expressão de CCL20 47
4.1.6 Expressão de CCL7 48
4.1.7 Expressão de CXCL1 48
4.1.8 Expressão de CXCL3 49
4.1.9 Expressão de IL-10 50
4.1.10 Expressão de IL-6 50
4.1.11 Expressão de TNF 51
4.1.12 Expressão de TNFRSF11b 51
4.1.13 Expressão de TGFB2 52
4.1.14 Expressão de CSF2 53
4.2 Análise histológica 53

5 DISCUSSÃO 55
6 CONCLUSÃO 59
7 ANEXO 60
7.1 Tabela. Fold change de todas as proteínas analisadas. 60

Conclusão: Tabela. Fold change de todas as proteínas analisadas. 61

8 REFERÊNCIAS* 62
Apêndices

1 INTRODUÇÃO

A pancreatite aguda (PA) é uma doença que frequentemente está associada a uma inflamação local e sistêmica não controlada que é responsável pela alta morbidade e mortalidade desta doença[1], sua forma mais grave é caracteriza por necrose infectada e pode levar ao acometimento de órgãos distantes e o desenvolvimento da síndrome de disfunção múltipla de órgãos (MODS)[2,3,4].

A PA é uma doença com vários fatores etiológicos, entre os quais os mais comuns são os cálculos biliares e o excesso do consumo de álcool, que juntos, representam 75% dos casos[2]. Independentemente do mecanismo inicial, o processo inflamatório ocorre após uma lesão das células acinares, ativando várias moléculas que pertencem a imunidade inata, produzidas por células epiteliais e do sistema imunológico, tais como citocinas e quimiocinas que são capazes de desempenhar um papel importante na patogênese dessa doença[5]. A inflamação pancreática induz distúrbios profundos na homeostase levando ao dano tecidual em outros órgãos, tais como o intestino[6] e o pulmão[7]. Por outro lado, órgãos como o cérebro[8] tem mecanismos estruturais e celulares de proteção contra a inflamação, e manifestações neurológicas dessa doença são raras.

Alterações no coração também têm sido descritas, tais como em pacientes com insuficiência cardíaca onde é possível encontrar uma variedade de vias e moléculas inflamatórias ativadas, assim como o aumento na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, ativação de células T e do sistema complemento[9]. Além da cascata inflamatória gerada durante todo o estágio da PA, o sistema cardiovascular pode sofrer alterações hemodinâmicas e eletrocardiográficas, algumas dessas alterações foram encontradas em um estudo experimental utilizando o modelo animal de PA em ratos que mostraram alterações cardíacas e histológicas compatíveis com o processo inflamatório desencadeado pela PA[10].

Sabemos que a intensidade da inflamação sistêmica devido à PA é semelhante em ratos jovens e idosos, porém, a duração da inflamação sistêmica é muito maior nos idosos. Isto se deve ao fato de que nos idosos a lesão da barreira intestinal é mais severa, consequentemente, há maior translocação bacteriana, ocasionando infecção sistêmica mais prolongada, falência múltipla de órgãos e consequentemente maior mortalidade[6].

A idade avançada é considerada um fator prognóstico independente para a mortalidade na pancreatite aguda, porém, os mecanismos envolvidos neste processo ainda não estão totalmente compreendidos[11]. No entanto, algumas possibilidades incluem a presença de um estado pró-inflamatório ou alterações específicas de órgãos, que podem contribuir para o aumento da inflamação sistémica na PA[7].

Apesar dos avanços recentes na terapia intensiva e exames de diagnósticos, o tratamento da PA continua sendo um desafio para a medicina. A pancreatite aguda possui um impacto significativo em muitos países como nos Estados Unidos, sendo uma das doenças gastrointestinais mais comuns que requerem internação hospitalar[7]. Dentre os óbitos, cerca de 50% ocorrem nos primeiros 14 dias da admissão, principalmente devido à síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e secundariamente à necrose pancreática, já os óbitos que ocorrem na fase tardia, geralmente ocorrem em função de complicações infecciosas e necrose pancreática[12,13]. O índice de mortalidade global varia de 15% a 20%[14]. Na população idosa a incidência e a gravidade da PA são maiores, assim como a taxa de mortalidade[14].

Estudos prévios realizados por nosso grupo mostraram, com efeito, alterações nos níveis da expressão gênica de mediadores inflamatórios associados com a gravidade da doença. Baseado nesses resultados, decidimos analisar a expressão gênica de diversas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de PA, com o objetivo de investigar os efeitos da inflamação sistêmica no coração e determinar se esses efeitos sofrem algum tipo de modificação durante a senilidade.

.

1.1 Definição e classificação da Pancreatite Aguda

A pancreatite aguda é definida como um processo inflamatório agudo do pâncreas com envolvimento variável de outros tecidos locais e órgãos à distância[15]. É subdividida em pancreatite edematosa intersticial e necrosante. A PA edematosa intersticial é caracterizada por uma inflamação no parênquima pancreático e nos tecidos peripancreáticos, e pelo aumento do pâncreas devido ao edema inflamatório, geralmente os sintomas clínicos desaparecem dentro de uma semana. A pancreatite necrosante está associada com necrose no parênquima pancreático e/ou necrose peripancreática que pode permanecer estéril ou se infectar levando a um aumento da gravidade da doença, e consequentemente da taxa de morbidade[16].

A determinação da gravidade da doença no momento da avaliação clínica inicial é essencial para que um melhor tratamento seja aplicado, já que permite a identificação precoce das complicações e a triagem de pacientes para tratamento em unidade de terapia Intensiva[13,17].

LANKISCH et al. 2009[18], definiram um escore clínico (HAPS – *Harmless Acute Pancreatitis Score*) que permite uma rápida identificação de casos leves de PA em aproximadamente 30 minutos após a admissão, que foi validado através de dois estudos prospectivos, um monocêntrico e outro multicêntrico. O escore clínico é composto por três parâmetros: ausência de descompressão brusca ou defesa à palpação abdominal, hematócrito e creatinina sérica normais. O nível de precisão é alto (98%), permitindo assim a identificação de forma rápida e eficaz dos pacientes que não necessitam de cuidados intensivos[3,19].

Vários outros escores prognósticos da PA e marcadores isolados tem sido propostos e utilizados a fim de se obter uma avaliação clínica precisa da gravidade da doença, tais como Critérios de Ranson, Glasgow, a dosagem da proteína C reativa, os critérios de APACHE II (*Acute Physiology and Cronic Health Care Evaluation II*) e os critérios tomográficos de Balthazar e colaboradores. Em 1992 foi criada a classificação de Atlanta com o intuito de

estabelecer um sistema padrão que fosse universalmente aplicável e que recentemente, em 2012 foi revisada[3,13,17].

Ranson e colaboradores identificaram 11 fatores de prognóstico ruim para a pancreatite alcoólica e biliar, sendo cinco desses fatores obtidos por ocasião da internação e seis que são identificados durante as primeiras 48 horas. Para os pacientes que apresentam dois ou menos fatores, a mortalidade é muito baixa (15%), quando mais de três desses fatores estão presentes, a mortalidade sobe (40%) e nos pacientes com sete ou oito fatores o aumento da taxa de mortalidade pode ser de até 100%[13].

A proteína C reativa é o marcador mais utilizado, é barata e fácil de ser dosada. O nível normal é de até 10 mg/l, já os níveis acima de 150 mg/l sugerem necrose pancreática[13].

O sistema APACHE II inclui 12 parâmetros fisiológicos, além de exames clínicos e laboratoriais que permitem definir a gravidade da doença em leve ou grave. Os critérios de APACHE II são mais sensíveis e específicos (75% e 92%) do que os critérios de Ranson (75% e 68%) em relação à gravidade e às complicações, 48 horas após a admissão[13, 20].

De acordo com a classificação de Atlanta, a gravidade clínica da PA é dividida em três categorias: leve, moderadamente grave e grave. Porém, uma nova estratificação da gravidade da doença mostrada resumidamente na Tabela 1, tem sido proposta, incluindo uma quarta categoria denominada como crítica. A PA leve é caracterizada pela ausência de necrose ou insuficiência de órgãos, sem complicações locais ou sistêmicas. Quando há presença de necrose estéril e/ou insuficiência temporária do órgão (insuficiência respiratória, cardiovascular e renal) a PA é definida como moderadamente grave, incluindo complicações locais ou sistêmicas, consequentemente, o índice de mortalidade é maior do que nos pacientes com PA leve. Na PA grave ocorre a presença de necrose infectada ou insuficiência persistente de órgãos (definida por uma pontuação Marshall modificada) com taxa de mortalidade de pelo menos 30%. Além disso, outro grau da gravidade tem sido sugerido por conter necrose infectada e insuficiência persistente de órgãos durante a PA, sendo assim, definido como crítica. No entanto, mais estudos serão

necessários para avaliar se é mais relevante manter três ou quatros categorias[3,20].

Tabela 1 – Estratificação da gravidade da PA, de acordo com a classificação de Atlanta (adaptada de Lankisch, 2015)[3].

Gravidade	Classificação - 1992	Classificação - 2012	Nova classificação sugerida - 2012
Leve	Não há insuficiência de órgãos e complicações locais	Não há insuficiência de órgãos e complicações locais ou sistêmicas	Ausência de necrose ou insuficiência de órgãos
Moderadamente grave	-	Falência temporária de órgão (<48 h) e/ou complicações locais ou sistêmicas sem insuficiência orgânica persistente (> 48 h)	Necrose estéril e/ou insuficiência temporária de órgão (<48 h)
Grave	Complicações locais e/ou insuficiência de órgãos	Insuficiência de órgãos persistente (> 48 h) de um único órgão ou de múltiplos órgãos	Necrose infectada ou insuficiência de órgãos persistente (> 48 h)
Crítica	-		Necrose infectada e insuficiência de órgãos persistente

1.2 Fisiopatologia

A patogênese da PA é determinada por um fator causal que desencadeia uma complexa cascata de eventos, incluindo a inflamação pancreática, destruição do tecido pancreático e uma resposta inflamatória sistêmica que é responsável pela morbidade e mortalidade desta doença[1]. Os principais fatores desencadeadores são os cálculos biliares e o excesso de ingestão alcoólica, que juntos correspondem a 75% dos casos, 15% correspondem a outras causas detalhadas na Figura 1 e os 10% restantes correspondem a causas idiopáticas[2].

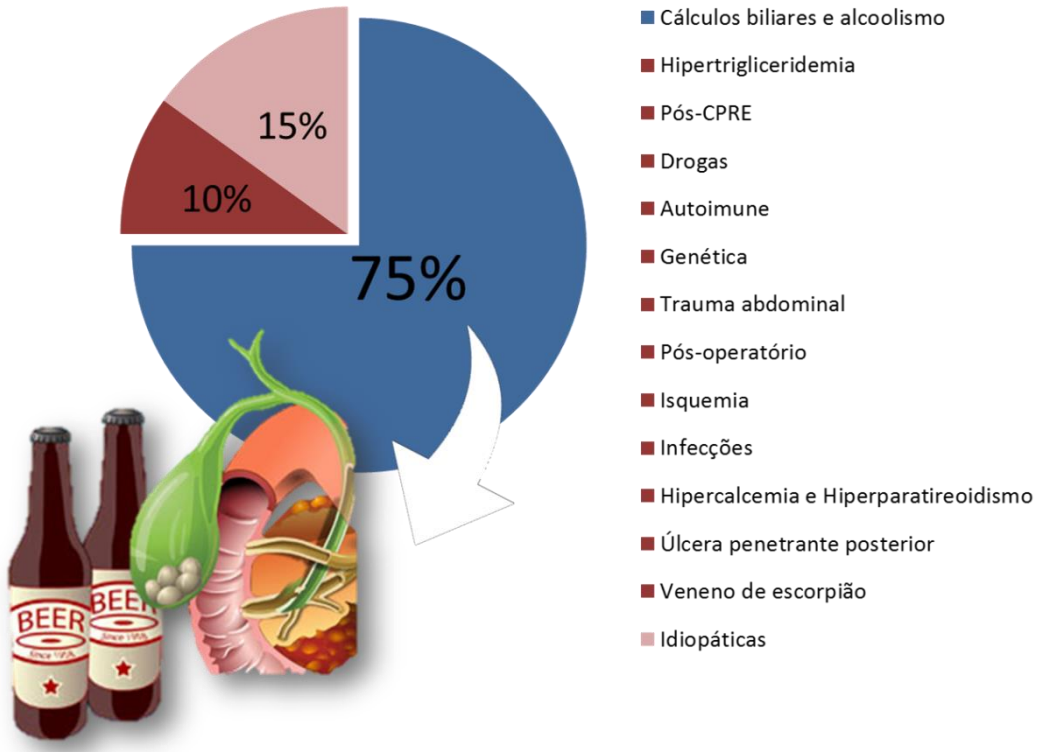

Figura 1 – Principais causas da pancreatite aguda (adaptada de Cappell, 2008)[2].

A obstrução do ducto pancreático, independente de qual seja o fator causal, leva a um bloqueio da secreção pancreática, que por sua vez impede a exocitose dos grânulos (contendo enzimas digestivas) de zimogênio. Consequentemente, os grânulos de zimogênio se ligam aos lisossomos intracelulares para formar o vacúolo autofágico contendo uma mistura de enzimas lisossomais e digestivas. A enzima lisossômica catepsina B pode ativar a conversão de tripsinogênio à tripsina. O acúmulo de tripsina ativa dentro dos vacúolos pode ativar uma cascata de enzimas digestivas que levam a lesão autodigestiva. Um bloqueio na exocitose apical saudável de grânulos de zimogênio pode causar exocitose basolateral nas células acinares, liberando zimogênios ativos para o espaço intersticial ao invés do lúmen acinar, subsequentemente, ocorre uma lesão induzida por protease nas membranas celulares[3,21]. A ativação prematura do tripsinogênio e autodigestão na PA foi descoberta através de modelos experimentais em pacientes com pancreatite hereditária, onde foi encontrada uma mutação no gene

tripsinogênio, resultando na formação de tripsina ativa que é resistente à degradação[3,20].

A lesão acinar gerada pelo processo de autodigestão estimula uma resposta inflamatória (infiltração de neutrófilos e macrófagos, e liberação de citocinas TNF-α e interleucinas 1, 6 e 8) no interior do parênquima pancreático. No entanto, a inflamação do parênquima também tem sido demonstrada em ratos sem tripsinogênio após hiperestimulação por ceruleína, sugerindo que a infiltração inflamatória pode ocorrer independentemente da ativação do tripsinogênio[3]. É importante ressaltar, que qualquer que seja o estímulo para a inflamação, em alguns casos, a reação pode ser grave, levando a insuficiência de múltiplos órgãos e sepse[3].

Os efeitos tóxicos do próprio ácido biliar nas células acinares têm sido visto como um possível fator patogênico na pancreatite biliar. Os ácidos biliares podem ser absorvidos pelas células acinares através de transportadores de ácido biliar localizados na membrana plasmática ou por um receptor de ácido biliar acoplado a proteína G (Gpbar1). Uma vez dentro da célula, os ácidos biliares aumentam as concentrações de cálcio, ativam as vias de sinalização, incluindo MAPK e PI3K, e o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB), induzindo assim a síntese de mediadores pró-inflamatórios[3].

Uma vez ativado, o NF-kB induz a transcrição de muitos genes envolvidos nas respostas inflamatórias e apoptose. Os alvos inflamatórios de NF-kB incluem as citocinas, quimiocinas, receptores imunológicos e moléculas de adesão. Um estudo utilizando ratos transgênicos, observou que o aumento da atividade de NF-kB em células acinares pancreáticas está relacionado diretamente com a gravidade da pancreatite e os altos níveis persistentes de NF-kB leva ao aumento da fibrose e perda de células do parênquima, causando uma condição parecida com pancreatite crônica[22].

Os efeitos do álcool sobre pequenos ductos pancreáticos e as próprias células acinares desempenham um papel importante na lesão pancreática. O álcool aumenta a propensão para a precipitação de secreções pancreáticas e à formação de tampões de proteína dentro dos ductos pancreáticos. Os tampões

de proteína ampliam e formam cálculos, causando danos no epitélio ductal adjacente e eventualmente, podem causar atrofia acinar e fibrose[3].

Estudos experimentais têm demonstrado que o álcool aumenta o teor de enzimas digestivas e lisossomais dentro das células acinares e desestabiliza as organelas que contêm essas enzimas, aumentando assim o potencial de contato entre enzimas digestivas e o lisossomo, facilitando a ativação intracelular prematura de enzimas digestivas. Estes efeitos do álcool em células acinares, são provavelmente resultantes do metabolismo do álcool no interior das células[3,21].

Os mecanismos envolvidos com a origem e complicações da PA ainda não estão totalmente esclarecidos, portanto, mais estudos se fazem necessários[21.] Contudo, tem sido estabelecido que, independentemente do mecanismo inicial, a PA é originada após a ativação enzimática mediada por cálcio e lesão da célula acinar que dá origem a dor abdominal e outros sintomas precoces. A progressão da doença pode levar a SIRS. Este processo sistêmico depende da interação entre mediadores pró-inflamatórios, mediadores anti-inflamatórios e quimiocinas[21]. Durante a fase inicial da SIRS uma resposta anti-inflamatória conhecida como síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (CARS), pode surgir como uma forma de compensar a resposta pró-inflamatória gerada, contudo, pode contribuir para o aumento da suscetibilidade a infecções[16]. A SIRS persistente leva ao desenvolvimento de complicações como a síndrome de disfunção múltipla de órgãos (MODS) e sepse que é resultante da translocação de bactérias do intestino a partir do lúmen intestinal para a circulação [5,21].

1.3 O papel das citocinas e quimiocinas na patogênese da PA

1.3.1 Citocinas

As citocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular, produzidas por células inflamatórias e células epiteliais, que estimulam, modulam ou até

mesmo inibem diferentes tipos de células do sistema imunológico[23]. Células como os neurófilos maduros têm sua função e migração influenciada pela ação de citocinas, bem como os mastócitos, basófilos e eosinófilos através das moléculas de adesão e ativação dos fatores quimiotáticos[24].

As citocinas produzidas por leucócitos e que atuam sobre eles são chamadas de interleucinas. Já aquelas com atividade quimioatratora são conhecidas como quimiocinas. As citocinas que causam a diferenciação e proliferação de células-tronco são chamadas de fatores estimuladores de colônias. E aquelas que interferem na replicação de vírus são denominadas de interferons[25].

Na década de 1990, estudos associaram o aparecimento de citocinas inflamatórias na circulação com a PA[23,26,27]. Desde então, numerosos estudos clínicos e experimentais têm sido realizados a fim de se compreender o processo inflamatório, bem como os principais mediadores envolvidos durante a vigência da PA (Tabela 2)[5,28,29].

Tabela 2 – Principais mediadores inflamatórios na PA.

Mediadores inflamatórios	Função
TNF-α	Pró-inflamatória: ativação de neutrófilos, alterações hemodinâmicas e na permeabilidade vascular, produção de novos mediadores inflamatórios, como IL-6[28,30,31]
IL-1	Pró-inflamatória: recrutamento de neutrófilos e expressão de moléculas de adesão[5]
IL-6	Ativação e crescimento de leucócitos, proliferação de células progenitoras mielóides, resposta na fase aguda na PA e pirexia[28]
C5	Citocina anafilatoxina que pode estar envolvida com lesão tecidual. Quimiotaxia e ativação de leucócitos. Papel anti- inflamatório e pró-inflamatório[28]
PAF	Ativação plaquetária; ativação de neutrófilos e quimiotaxia[28]
IL-10	Anti-inflamatória: inibe a liberação de citocinas pró-inflamatórias[5,28]
IL-12	Induz a proliferação de células T, a produção de IFN-γ, aumento da atividade citotóxica destas células e induz a polarização das células T $CD4^+$ para o fenótipo Th1[32]
IL-12 e IL-18	A ação sinérgica de IL-12 e IL-18 pode aumentar os níveis séricos de IFN-γ e a expressão de linfócitos $CD8^+$ infiltrados no pâncreas na PA grave[33]. Também pode facilitar a ativação prematura da tripsina e autodigestão pancreática[34]

Como já mencionado anteriormente, a pancreatite é desencadeada inicialmente pela lesão das células acinares do pâncreas, em seguida pela resposta inflamatória gerada através da 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, óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio e metabólitos do ácido araquidônico (Figura 2).

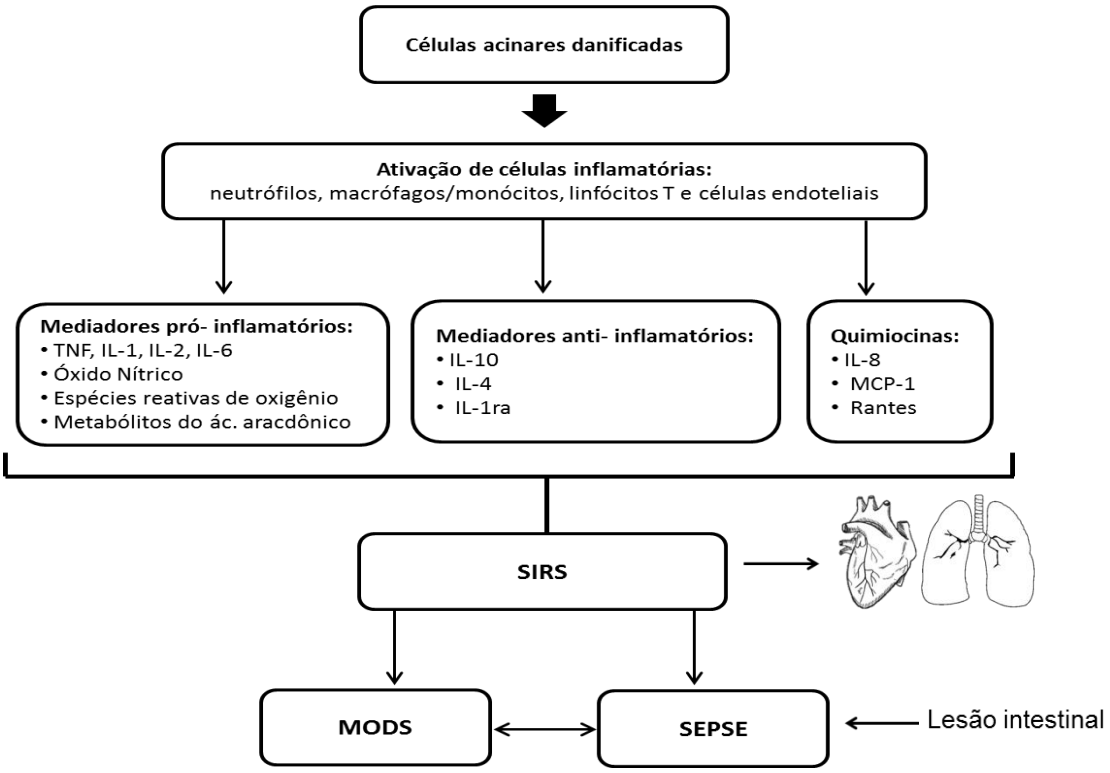

Figura 2 – Papel das citocinas e células inflamatórias na Pancreatite Aguda (adaptada de Makhija, 2002)[5].

Quando as respostas protetoras locais se tornam ineficientes ocorre uma amplificação e extensão dos mediadores inflamatórios locais para a circulação sistêmica, levando a SIRS, que juntamente com o aumento do fluido no tecido e a disfunção na microcirculação, levam à disfunção de múltiplos órgãos, e eventualmente a insuficiência de múltiplos órgãos, a qual está associada com maior mortalidade[35]. Desse modo, as citocinas desempenham um papel chave

no curso da doença, podendo levar a PA de um processo inflamatório local a uma doença de múltiplos órgãos [6,10,23].

O prognóstico da PA está diretamente relacionado com a intensidade da sua resposta inflamatória. Os níveis elevados das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 e o fator de necrose tumoral α (TNF-α) que também é encontrado na sepse grave, estão relacionados com a gravidade da doença, podendo inclusive ser utilizados na clínica para inferir a intensidade do processo inflamatório[6,10,28,36,37].

.Um dos principais mediadores inflamatórios é o IL-6, produzido por uma variedade de células, incluindo monócitos/mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e pelas células musculares lisas. Em um estudo utilizando camundongos transgênicos que expressavam altos níveis de IL-6, foi possível observar uma maior suscetibilidade desses animais a pancreatite aguda, por outro lado, quando aplicado um anticorpo monoclonal anti-IL-6 nesses animais, notou-se um efeito protetor[38]. Outro estudo em seres humanos em que foi dosado IL-6 em pacientes com PA grave e PA leve indicou que quanto mais elevado os níveis de IL-6 maior a gravidade da pancreatite[5].

O TNF-α também tem sido muito estudado, por ter relação com a SIRS e, consequentemente, com a PA[5,39]. Apesar de sua difícil quantificação no plasma sanguíneo, alguns trabalhos mostram o seu aumento de 30% a 40% em pacientes com PA. TNF-α é responsável pela ativação de neutrófilos e por alterações hemodinâmicas e na permeabilidade vascular, além de produzir novos mediadores inflamatórios como IL-6[30,31].

A interleucina 1 (IL-1), por sua vez, é muito importante na cascata inflamatória na PA, visto que proporciona recrutamento e degranulação dos neutrófilos e expressão de moléculas de adesão. Tem papel sinérgico com TNF-α, diferindo deste por não causar apoptose diretamente[5].

Alguns modelos experimentais de pancreatite mostram IL-1 e TNF como as principais citocinas patológicas associadas com a destruição do tecido local e sistêmico. Um estudo com animais *knockout* ajudou a compreender se IL-1 e/ou TNF são necessários para o início e o desenvolvimento da pancreatite. A PA foi induzida em animais com a ausência de receptores de IL-1 ou TNF, e o

resultado foi que, esses animais não conseguiram desenvolver a pancreatite a nível máximo. O resultado desse estudo mostra que a pancreatite não é acionada ou induzida por IL-1 e/ou TNF, mas ambos desempenham um papel importante e muito prejudicial para a sua progressão[23]. Outro estudo com ratos mostrou, que tanto o bloqueio do receptor de IL-1 quanto a neutralização de TNF-α utilizando anticorpo policlonal está associado com a diminuição da gravidade da doença[40].

A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória que induz a proliferação de células T, a produção de IFN-γ, aumento da atividade citotóxica destas células e induz a polarização das células T $CD4^+$ para o fenótipo Th1 que medeia à imunidade contra patógenos intracelulares[32]. Os níveis séricos e pancreáticos de IL-12 especialmente em combinação com a IL-18 são elevados em pacientes com PA e estão correlacionados com a gravidade da doença. Estudos utilizando um modelo animal em camundongos obesos mostraram que houve uma lesão pancreática nesses animais induzida por IL-12 juntamente com IL-18. Nesse estudo, o IFN-γ pareceu ser o principal fator associado a PA, porque a neutralização da atividade dessas citocinas protegeram os camundongos da lesão pancreática[33]. A presença simultânea de IL-12 e IL-18 também resulta na produção de óxido nítrico e de reativos intermediários do oxigênio em neutrófilos e macrófagos, podendo facilitar a ativação prematura de tripsina intrapancreática e autodigestão pancreática[34].

Como mencionado anteriormente, as citocinas pró-inflamatórias são liberadas durante a pancreatite aguda, e seu nível plasmático está relacionado com a gravidade da doença. Por ouro lado, uma resposta anti-inflamatória também é observada, com a produção de mediadores anti-inflamatórios como IL-10 e IL-4 denominada de CARS[41]. Essa resposta anti-inflamatória parece atenuar os efeitos gerados pela resposta inflamatória e o seu nível parece ser inversamente proporcional à gravidade da pancreatite. Estudos com animais, mostraram que a IL-10 diminuiu os níveis de marcadores inflamatórios reduzindo a gravidade da pancreatite[42,43]. Contudo, a CARS excessiva pode tornar as funções do sistema imunológico ineficientes, levando ao aumento da

susceptibilidade a infecções, sendo assim, também está relacionada com a gravidade da doença[5,35,41,44].

1.3.2 Quimiocinas

As células inflamatórias citadas anteriormente como os leucócitos, normalmente circulam no sangue em um constante estado vigilante e têm um papel chave na defesa do organismo. Quando há ocorrência de lesão tecidual ou infecção, essas células com funções efetoras são recrutadas por quimiocinas, a fim de gerar uma resposta contra agentes infecciosos e outros insultos fisiológicos, além de reparar os danos teciduais. Geralmente, os leucócitos mais recrutados da corrente sanguínea em direção ao sítio da inflamação aguda são os neutrófilos.

As quimiocinas são uma família de pequenas proteínas conhecidas como citocinas quimiotáticas[45]. A principal função das quimiocinas é o recrutamento e ativação de leucócitos em direção ao sítio da inflamação, mas também estão envolvidas com o tráfego de linfócitos e outros leucócitos através dos tecidos[45,46,47,48]. Essa interação entre as quimiocinas e as células inflamatórias é possível por meio da especificidade de ligação com seus receptores[24]. As quimiocinas são dividias em quatro famílias, classificadas de acordo com a presença ou ausência e localização de resíduos de aminoácidos entre as cisteínas amino-terminais[49]. As duas principais famílias são CC (duas cisteínas ligadas diretamente) que possui atividade quimioatraente para monócitos e linfócitos e CXC (duas cisteínas separadas por um resíduo de aminoácido) que são quimioatraentes para neurófilos[46,49]. Os neutrófilos são ativados especificamente pelas quimiocinas CXCL1 e CXCL2, enquanto que os monócitos, eosinófilos e células T são ativados por CCL2 (MCP-1) e CXCL10 (Figura 3) [41]. Além dessas famílias, existem ainda aquelas com apenas uma cisteína (C) na porção amino-terminal e CX3C com duas cisteínas separadas por três resíduos de aminoácido[49].

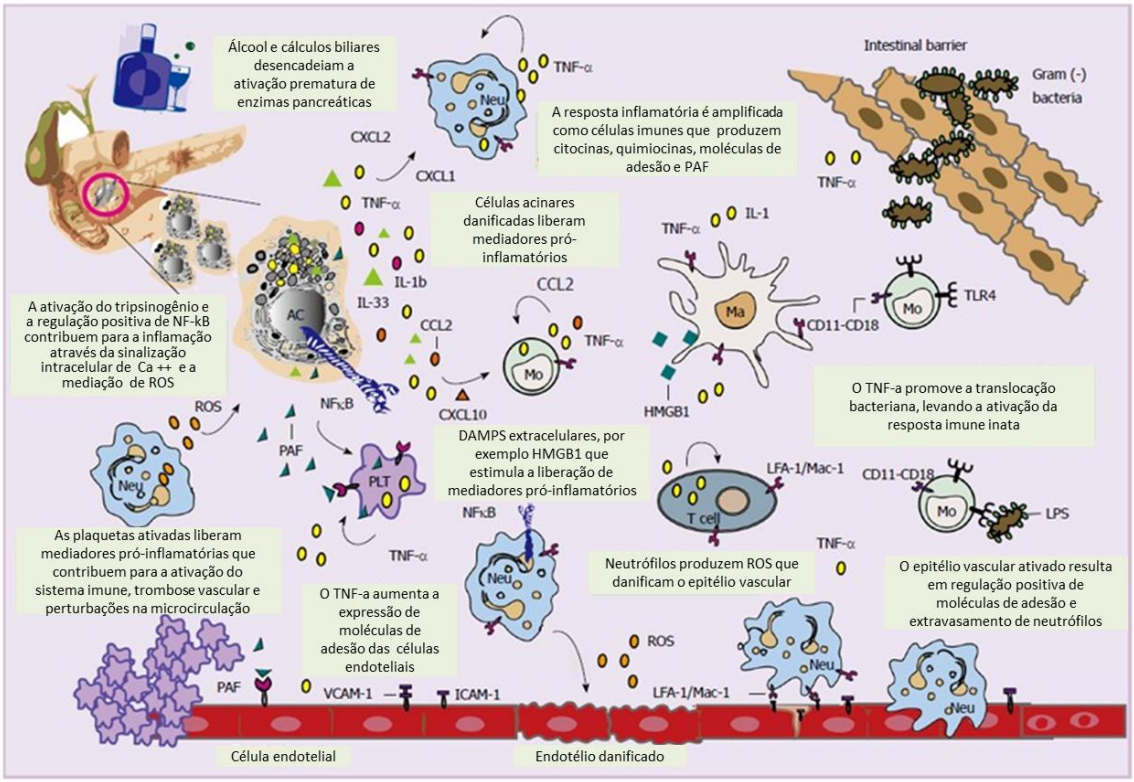

Figura 3 – Mecanismos da resposta imune desenvolvidos na PA. Um fator desencadeante inicia a ativação do tripsinogênio. Células acinares danificadas liberam mediadores pró-inflamatórios atraindo leucócitos para o local da inflamação. A ativação de leucócitos leva a um aumento da agregação de leucócitos através do aumento na expressão de moléculas de adesão e infiltração no tecido. Estas células aumentam a produção de citocinas e de outros mediadores inflamatórios. Ocorre o aumento da permeabilidade vascular, resultando em extravasamento e ativação de neutrófilos, edema e distúrbios microvasculares. Mediadores pró-inflamatórios contribuem para a falha da função da barreira intestinal. Neu: neutrófilos; AC: célula acinar; Mo: monócitos; Ma: macrófagos; ICAM-1: molécula de adesão intercelular 1; ROS: espécies reativas de oxigênio; VCAM-1: molécula de adesão vascular 1; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa; NF-kB: fator de transcrição nuclear kappa B; IL: interleucina; CXCL: CXC quimiocinas (CXC motif); CCL: quimiocinas (CC motif); PLT: plaquetas; TLR: receptor Toll-like; LPS: lipopolissacarídeo; LFA: antígeno associado a função linfocitária; Mac-1: antígeno de macrófago-1. (adaptada de Akinosoglou, 2014)[41].

As quimiocinas também são classificadas de acordo com critérios funcionais, como as quimiocinas inflamatórias que são expressas por leucócitos e outras células circulantes somente depois da ativação e as quimiocinas homeostáticas que são expressas constitutivamente. No entanto, algumas quimiocinas se enquadram em ambas as definições, dependendo do contexto biológico ou estado patológico[47].

Muitas quimiocinas têm sido relacionadas com alguns dos fatores de propagação da pancreatite. Células acinares expressam uma variedade de citocinas e quimiocinas após a indução da pancreatite aguda e resposta inflamatória sob efeito do álcool[50,51]. Além disso, níveis de quimiocinas têm sido associados com a ativação precoce da resposta inflamatória desencadeada pela pancreatite aguda, podendo ainda, serem usadas como marcadores da doença[52].

A composição de citocinas e quimiocinas pode modular de maneira significativa a patogênese de muitas doenças: autoimunes (artrite reumatoide, psoríase), inflamatórias (dermatite atópica, alergias, asma, aterosclerose)[24] e incluindo aquelas associadas com eventos cardiovasculares. Um estudo mostrou níveis elevados da expressão de IL-8 e MCP-1 no tecido do miocárdio, associado com doenças inflamatórias do músculo cardíaco[53]. Além disso, ativação de MCP-1 pode contribuir para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca congestiva em animais[54].

1.4 Relação de citocinas e a disfunção miocárdica

Nos pacientes com falência cardíaca é possível encontrar uma variedade de vias e moléculas inflamatórias ativadas, assim como o aumento na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, ativação de células T e do sistema complemento e a formação de autoanticorpos. Está cascata inflamatória geralmente se dá em resposta a uma lesão, mais especificamente lesão vascular ou cardíaca, e exerce um efeito local, podendo se expandir facilmente[9].

O sistema cardiovascular desempenha um papel chave na fisiopatologia do choque séptico, falência de órgãos e morte. Estudos in vitro mostraram que as citocinas, possuem efeitos cardiodepressores[55,56].

Citocinas pró-inflamatórias TNFα, IL-1b e IL-6 foram estudadas, a fim de correlacioná-las com a disfunção miocárdica (Figura 4)[9,56]. Porém os mecanismos responsáveis pela disfunção miocárdica séptica ainda

permanecem desconhecidos, e a associação de citocinas circulantes com a disfunção miocárdica séptica ainda não está totalmente clara. A disfunção diastólica é um forte preditor de mortalidade em pacientes com sepse grave e choque séptico[56].

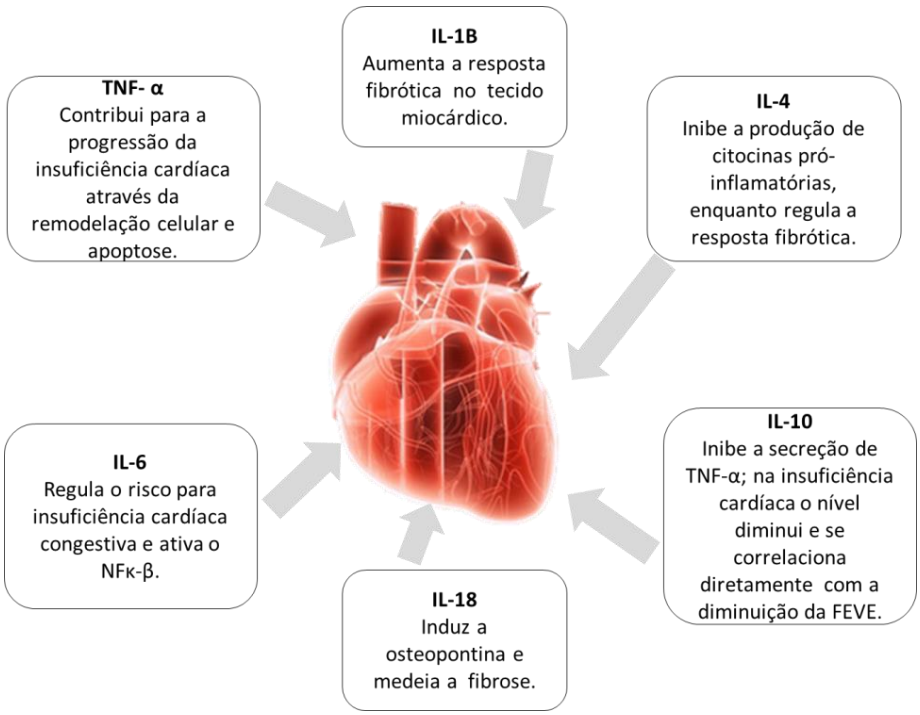

Figura 4 – Citocinas envolvidas na insuficiência cardíaca congestiva[9].

Estudos mostraram mudanças significativas nos níveis de citocinas sistêmicas, alterações ultra-estruturais do miocárdio, incluindo edema intersticial, hipertrofia e hipóxia das células musculares cardíacas, aumento da função contrátil da fibra muscular, deposição de colágeno no estroma do miocárdio, mudanças cardíacas e histológicas compatíveis com o processo inflamatório desencadeado pela PA[10].

Meyer et al. detectaram em experimentos com modelo animal de PA, níveis séricos elevados de IL-6, IL10 e TNF-α 2 horas após a indução de PA. Diferentes padrões de resposta foram encontrados para TNF e IL-6 após estímulos fisiológicos agudos, provavelmente por causa dos diferentes tempos de liberação e regulação dessas citocinas. O TNF-α aparece no início e em seguida a IL-6 que suprime a expressão de TNF-α, como observado em ratos

12 horas após a indução de PA, onde os níveis séricos de IL-6 se elevaram e os níveis de TNF-α diminuíram, porém nos grupos de 24 horas e 15 dias houve um aumento nos níveis de TNF-α em comparação com o grupo *sham* e o grupo de 2 horas. O aparecimento tardio de TNF-α pode estar relacionado com as características histológicas associadas com a morte de células cardíacas[10].

Os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 está correlacionada com a expressão de TNF e IL-6. Estudos mostraram a associação variável de IL-10 com a lesão tecidual e a gravidade da PA, que demonstra que pode ser utilizado como um preditor da gravidade. No entanto, resultados conflitantes foram mostrados em outro estudo[10,23].

Experimentos mostraram que há aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias intracardíacas, e redução de citocinas anti-inflamatórias, em particular, a IL-10. Estas alterações inflamatórias são associadas com o aumento da hipertrofia e da fibrose e uma diminuição da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) [9,10].

Alterações significativas no coração como a degeneração vacuolar, picnose e a perda de núcleos e linfócitos, foram encontradas em um estudo histológico. Estas alterações podem estar relacionadas com a resposta inflamatória desencadeada pela PA grave[10].

Alterações estruturais e a resposta inflamatória sistêmica grave do miocárdio, tais como edema intersticial e mitocondrial e necrose miocárdica têm sido correlacionadas. Por outro lado, observou-se uma diminuição da contratilidade do miocárdio na presença de sepse, mesmo na ausência de lesão de tecidos[10].

Estudos mostraram que os miócitos cardíacos, quando estimulados por pressão ou carga de volume, produzem TNF-α. A produção local se expande para a circulação, logo, contribui para a ativação imune e a inflamação sistêmica[9].

Pacientes com insuficiência cardíaca possuem níveis elevados de TNF-α e IL-6, que estão diretamente correlacionados com um prognóstico pior[9]. O aumento da expressão de TNF-α no tecido miocárdico está associado com a indução da morte celular através do estresse oxidativo cardíaco e com a

redução da função cardíaca encontrada na sepse, devido ao elevado número de macrófagos. Os níveis de IL-6 podem estar correlacionados com a disfunção cardíaca aguda[9,10].

A resposta sistêmica decorrente da lesão cardíaca é caracterizada por mecanismos que visam a reestabelecer a estabilidade hemodinâmica e, em seguida, melhorar e reparar a lesão tecidual[9,10].

1.5 A importância da barreira intestinal

Conforme já mencionado, a barreira intestinal tem grande importância na homeostase do nosso organismo, incluindo suas respostas imunes que são reguladas para que haja equilíbrio entre as células que promovem a defesa e as que suprimem a inflamação, de modo que ao interrompermos o seu perfeito funcionamento originamos doenças graves com altas taxas de mortalidade e morbidade.

A barreira intestinal, no entanto, 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 significantemente para a piora no prognóstico da doença.

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, mas, principalmente, pela exacerbada resposta inflamatória que proporciona a liberação de diversos mediadores inflamatórios, como TNF-α, interleucinas 1, 6 e 8, e fator ativador plaquetário (PAF)[57,58,59]. O TNF-α, pode ainda, contribuir com o aumento da permeabilidade intestinal e promover a translocação bacteriana, levando a ativação da resposta imune inata[41].

O intestino delgado é um dos órgãos distantes mais afetados na PA, devido à perturbação na microcirculação, hipovolemia, vasoconstrição e até mesmo isquemia-reperfusão. Desempenha papel importante, pois a partir do

momento em que ocorrem os fatos já citados, ocorre a disfunção da barreira intestinal que contribui muito para a translocação de bactérias e endotoxinas para o pâncreas e para a corrente sanguínea[60].

Leong et al.[61] demonstraram que em estados patológicos como PA, quimioterapia, radioterapia e infecção grave, 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 aumento da apoptose dessas células.

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

Esses mediadores inflamatórios são responsáveis pelos sintomas de insuficiência respiratória, insuficiência renal, instabilidade hemodinâmica, alterações na permeabilidade vascular que compõem a SIRS podendo levar posteriormente a MODS[4].

1.6 Pancreatite Aguda e Senilidade

O sistema imune inato é composto por várias células, como neutrófilos, células NK e NKT, monócitos/macrófagos e as células dendríticas. Falhas associadas ao envelhecimento são observadas na ativação de todos estes tipos de células, relacionados com as vias de transdução de sinal comprometidas, incluindo os receptores tipo Toll. No entanto, não é só a imunidade inata que é afetada durante a senilidade, mas a adaptativa também sofre com a diminuição de linfócitos T CD4 e CD8 devido à involução do timo e consequentemente diminuição da produção de linfócitos T[6,62,63]. Esse estado de exaustão do sistema imunológico é caracterizado por um processo pró-inflamatório constitutivo conhecido como *Inflammaging*[6,11,63].

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 e reperfusão e durante a sepse.

Franceschi et al.[64] relatam a possibilidade desses eventos estarem relacionados com a exaustão do sistema imune, em que esse sistema fica apto a produzir maior quantidade de citocinas inflamatórias e outros fatores de crescimento relacionados à infecção.

A PA é uma patologia com alta taxa de mortalidade, em torno de 20% a 25%[65,66]. Quando focamos em pacientes de idade avançada, a PA é mais grave, com maior morbidade e mortalidade. Embora se tenha observado que as lesões locais pancreáticas e peri-pancreáticas não difiram do jovem, as lesões sistêmicas são muito mais intensas no idoso, o que contribui para a maior morbidade e mortalidade dessa população[67].

Os mecanismos pelos quais pacientes idosos estão 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. Um trabalho recente de nosso laboratório demonstrou que nos animais idosos a PA induz lesões intestinais mais intensas com maior produção de citocinas pró-inflamatórias, maior expressão de Cox2, maior translocação bacteriana e menor capacidade de reparação das lesões intestinais[68].

Uma das possíveis causas da maior mortalidade relacionada a PA nos idosos seria o comprometimento do miocárdio pelo processo inflamatório sistêmico desencadeado pela doença ou a uma maior inflamação local com maior produção de citocinas ou quimiocinas levando a insuficiência cardíaca e portanto a maior mortalidade.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral analisar a expressão gênica de diversas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no miocárdio de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de PA, a fim de compreender os efeitos da inflamação sistêmica no coração durante a vigência da pancreatite aguda e determinar se esses efeitos sofrem algum tipo de modificação na senilidade.

2.1 Objetivos Específicos

De modo específico, este estudo busca:

- Verificar a expressão gênica de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens com e sem pancreatite;
- Quantificar a infiltração de neutrófilos no tecido cardíaco de idosos e jovens com e sem pancreatite.

3 MÉTODOS

3.1 Local de Realização dos Experimentos

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).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da faculdade de medicina da USP, sob n°.141/14.

3.2 Amostra

Ratos Wistar, machos, jovens (8 semanas) de 200g a 350g e idosos (18 meses) de 600g a 850g, foram obtidos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos em gaiolas no Biotério de Experimentação da Disciplina de Reumatologia – Departamento de Clínica Médica, em água e ração "*ad libidum*" e em temperatura ambiente controlada. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de Ketamina (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 em quatro grupos:

- Animais jovens submetidos à pancreatite (n=4).
- Animais jovens controles (n=6).
- Animais idosos submetidos à pancreatite (n=5).
- Animais idosos controles (n=5).

3.3 As 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 a visualização do ducto pancreático. Com agulha, perfurou-se o duodeno a uma profundidade de 5 mm abaixo da papila do ducto pancreático e, uma cânula de polietileno PE-50 (*Intracath, Becton-Dickson,* USA*)*, foi inserida no ducto pancreático.

Foi colocado um *clamp* na porção superior do pâncreas, onde se injetou ácido taurocólico 2,5% (*Sigma Chemical CompanyTM*, St. Louis, USA) na dose de 0,5ml em ambos os grupos. Um trabalho anterior do nosso laboratório havia demonstrado que com o envelhecimento os animais se tornam obesos, porém o pâncreas permanece com as mesmas dimensões. Após a injeção do ácido, o *clamp* foi retirado e o animal foi suturado.

Após 11 horas da indução de pancreatite aguda, os animais foram sacrificados com doses letais de Ketamina e Xilazina. Amostras do tecido cardíaco foram coletadas e armazenadas em freezer -80 ºC para posterior análise.

As amostras do tecido cardíaco foram pulverizadas em um almofariz que estava em contato com nitrogênio líquido. As amostras então foram maceradas e colocadas em tubos contendo 1 mL de Trizol para cada 100 g de tecido macerado.

3.3.2 Extração de RNA

Para extração de RNA dos tecidos cardíacos pulverizados, foram adicionados 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol, as amostras foram incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente e, posteriormente, foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000 g a 4ºC. O sobrenadante (fase

incolor) foi aspirado e transferido para outro tubo. Foram adicionados 500 µL de isopropanol gelado e em seguida, foram incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. Os tubos foram vertidos algumas vezes e centrifugados por 15 minutos a 12.000 g a 4ºC. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado vertendo o tubo e localizando o *pellet*. Foi adicionado 1 mL de etanol gelado a 70%, o *pellet* foi solto e centrifugado mais uma vez por 10 minutos, 12.000 g a 4ºC. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, o tubo ficou aberto sobre a bancada por 5 minutos para secagem do *pellet* que foi suspendido novamente com 40 µL de água DEPC.

3.3.3 Tratamento com DNase

Após a extração de RNA, foi feito o tratamento deste com DNase. Foram diluímos 2 µL de DNAse em 200 µL de *buffer* de DNase. Foram acrescentados 4 µL dessa diluição em cada amostra de RNA extraído, depois foram incubados em temperatura ambiente por 10 minutos. Foi adicionado 1 µL de EDTA em cada amostra e, em seguida foram incubados a 65ºC por 10 minutos.

3.3.4 Quantificação de RNA

O RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoVue™ Plus (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). A razão 260/280 nm foi determinada para avaliar a contaminação por proteínas. Sendo assim, foram consideradas de boa qualidade as amostras cujos valores de referência da razão 260/280 nm estivessem entre 1,8 e 2,0.

3.3.5 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit *RT² First Strand Kit – Rat Cytokines & Chemokines* (Qiagen). Para tal, foi preparado o *DNA elimination mix* para cada amostra, contendo os seguintes componentes: a amostra de RNA (volume variável), Buffer 2 µL e água *RNase-free,* (volume variável) obteve-se um volume final de 10 µL em um tubo de 0,2 ml. O *mix* foi levado ao termociclador por 5 minutos a 42°C, em seguida, levado ao gelo imediatamente por 1 minuto no mínimo. Na sequência, foi preparado o *Reverse-transcription mix* contendo: 5x *Buffer BC3* (4 µL), *Control P2* (1 µL), *RE3 Reverse Transcriptase Mix* (2 µL) e água *RNase-free* (3 µL), logo, obteve-se um volume final de 10 µL. O *DNA elimination mix e* o *Reverse-transcription mix* foram colocados em um mesmo tubo onde foram pipetados gentilmente até que uma mistura homogenia fosse obtida. O tubo foi levado ao temociclador por 15 minutos a 42°C, logo em seguida, por mais 5 minutos a 95°C. Foi adicionado 91 µL de água *RNase-free* no tubo. O tubo contendo a reação da síntese de cDNA foi mantido no gelo, enquanto a próxima etapa foi preparada.

3.3.6 Análise da expressão gênica – RT-PCR array

Dentro do *Airclean* PCR, foi preparado o *PCR componentes mix* contendo: 2x *RT² SYBR Green*, a reação da síntese de cDNA e água *RNase-free,* onde foram pipetados repetidas vezes até que uma mistura homogenia fosse obtida. Em seguida, foi utilizada uma placa com 96 *wells* contendo 84 genes chaves envolvidos na resposta imune que estão elencadas na Tabela 3, além de 5 *housekeeping* genes, controles positivos, controles de transcrição reversa e controle de DNA genômico. Em cada *well* foi adicionado 10 µL do *PCR componentes mix*. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao aparelho de PCR *Step One* (Applied Biosystems Carlsbad, CA, USA). A análise dos dados foi feita através do *RT² Profiler PCR Array Web-based Data*

Analysis Portal (Qiagen), os genes B2m (Beta-2-Microglobulina) e Rplp1 (Proteína Ribossomal P1) foram determinados como genes *housekeeping*.

Tabela 3 – Citocinas analisadas através do PCR *Array*.

Quimiocinas				
Ccl1	Ccl11	Ccl12	Ccl17	Ccl19
Ccl2	Ccl20	Ccl21	Ccl22	Ccl24
Ccl3	Ccl4	Ccl5	Ccl7	Cx3cl1
Cxcl1	Cxcl10	Cxcl11	Cxcl12	Cxcl13
Cxcl16	Cxcl3	Cxcl9	Pf4	Ppbp
Xcl1				
Interleucinas				
Il10	Il11	Il12a	Il12b	Il13
Il15	Il16	Il17a	Il17f	Il18
Il1a	Il1b	Ilrn	Il2	Il21
Il22	Il23a	Il24	Il27	Il3
Il4	Il5	Il6	Il7	Il9
Interferons				
Ifna2	Ifng			
Fatores de crescimento				
Bmp2	Bmp4	Bmp6	Bmp7	Cntf
Csf1	Csf2	Csf3	Gpi	Lif
Mstn	Nodal	Osm	Thpo	Vegfa
Membros da superfamília do receptor de TNF				
Cd40lg	Cd70	Faslg	Lta	Ltb
Tnf	Tnfrsf11b	Tnfsf10	Tnfsf11	
Outras citocinas				
Adipoq	C5	Ctf1	Gdf15	Mif
Spp1	Tgfb2			

3.3.7 Histologia

O coração foi lavado com solução fisiológica 0,9% e fixado com solução tamponada de formol 10%. A porção equatorial dos ventrículos foi processada em parafina e dela obtidos cortes histológicos transversais de 5 µm de espessura montados em lâminas de vidro. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina. As medidas histomorfométricas foram realizadas utilizando-se um sistema computadorizado de imagens (Nis Element Software, Nikon, Tokyo, Japan). As áreas da parede do ventrículo esquerdo foram determinadas

sob a objetiva de 40x. Foram considerados 30 campos microscópicos para análise morfométrica por corte histológico, com área total de 67.512 µm². Para estimativa da inflamação, foi determinada a infiltração de neutrófilos.

3.4 Análise Estatística

As características dos casos e controles foram comparadas por intermédio do teste ANOVA, bem como calculado respectivo intervalo de confiança de 95% (IC95%); e um valor de P bi-caudado de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. O teste *post-hoc* de Tukey também foi aplicado. A análise foi feita no programa *GraphPad InStat 3* (GraphPad InStat Inc., San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

Entre as citocinas estudadas, a expressão das interleucinas IL-6 E IL-10, e as quimiocinas CCL7 e CCL19 nos ratos idosos com PA foi menor do que nos ratos jovens com PA. Entretanto, os níveis de CXCL3 e CCL20 aumentaram nos idosos com PA. A expressão de CCL20 e CCL19 foi significativamente alta em ambos os grupos jovens e idosos com PA quando comparados com seus respectivos controles. Nos idosos com PA houve uma redução na expressão de CXCL1, CCL1, CCL11 e IL-10 comparados com seus controles, já entre os grupos saudáveis os idosos expressaram mais do que os jovens.

A expressão gênica de TNF-α, alguns membros dos receptores da superfamília de TNF, fatores de crescimento e outros mediadores inflamatórios investigados não mostraram diferenças estatísticas entre os grupos de animais saudáveis e os animais com pancreatite.

A lista completa com os valores de *fold change* de todas as citocinas e quimiocinas investigadas encontra-se disponível no Anexo. E aquelas que mostraram diferenças estatísticas significantes foram demonstradas por meio de gráficos.

Na análise histológica, a infiltração dos neutrófilos foi significativamente maior no tecido cardíaco dos ratos jovens e idosos com PA, comparado com seus controles. Porém, a infiltração dos neutrófilos foi significativamente menor nos idosos com PA quando comparado com os jovens com PA.

4.1 Expressão gênica de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento

4.1.1 Expressão de C5

O grupo Controle Idoso obteve expressão estatisticamente significante maior em relação ao grupo Controle Jovem. O grupo Pancreatite Idoso

sofreu uma redução na expressão de C5 estatisticamente significante quando comparado ao seu controle (Figura 5).

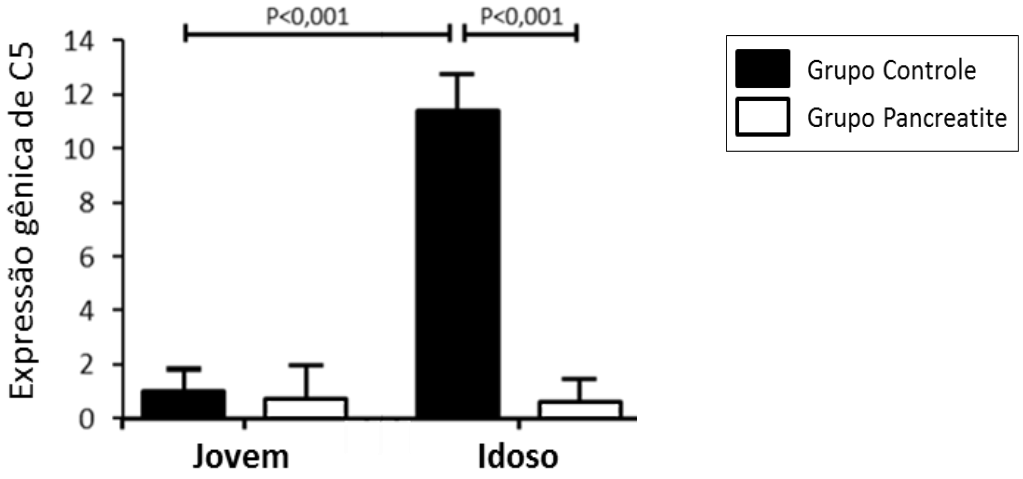

Figura 5 – Expressão de C5 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.

4.1.2 Expressão de CCL1

O grupo Controle Idoso obteve expressão estatisticamente significante maior em relação ao grupo Controle Jovem. O grupo Pancreatite Idoso sofreu uma redução na expressão de CCL1 estatisticamente significante quando comparado ao seu controle (Figura 6).

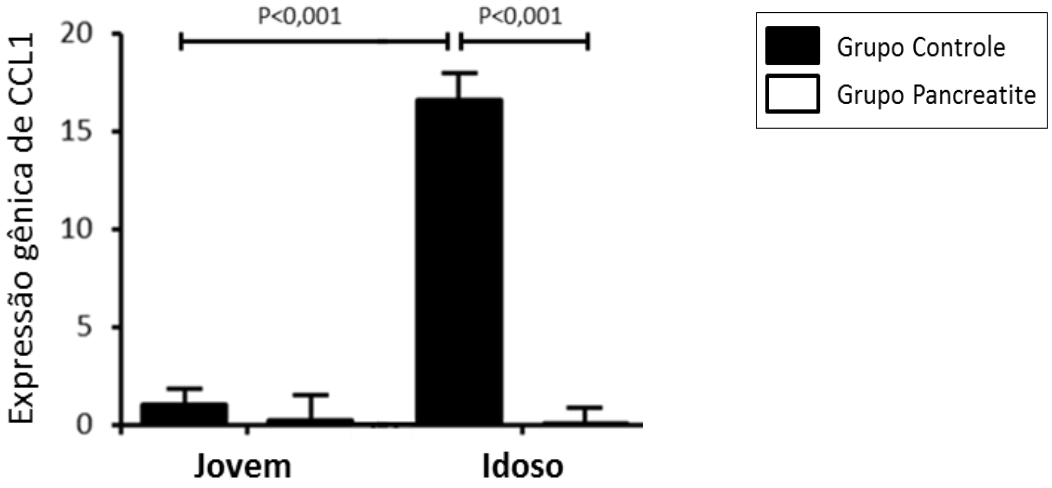

Figura 6 – Expressão de CCL1 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.

4.1.3 Expressão de CCL11

O grupo Controle Idoso obteve expressão estatisticamente significante maior em relação ao grupo Controle Jovem. O grupo Pancreatite Idoso sofreu uma redução na expressão de CCL11 estatisticamente significante quando comparado ao seu controle (Figura 7).

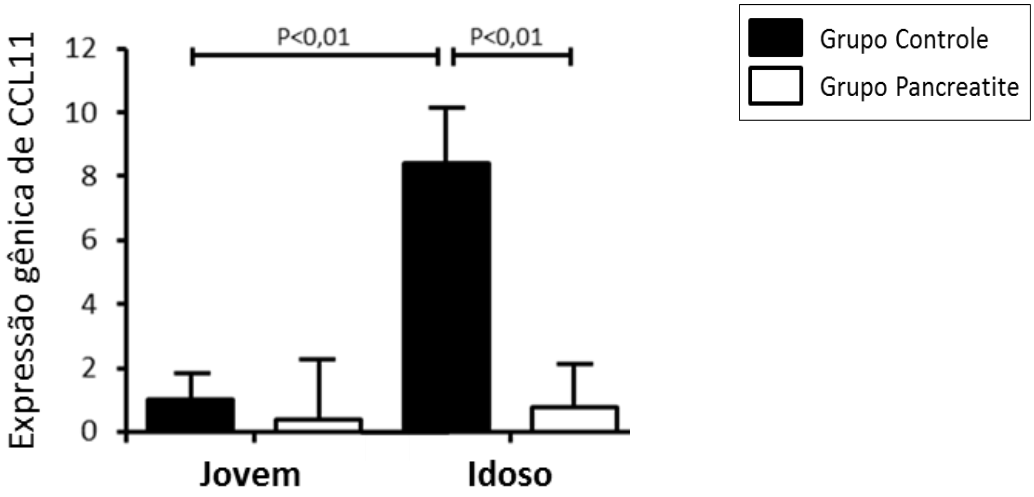

Figura 7 – Expressão de CCL11 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.

4.1.4 Expressão de CCL19

A quimiocina CCL19 mostrou níveis significativamente baixos em ratos idosos com PA comparados a ratos jovens com PA. Entre os grupos de animais com pancreatite houve uma expressão aumentada de CCL19 quando comparados com seus controles (Figura 8).

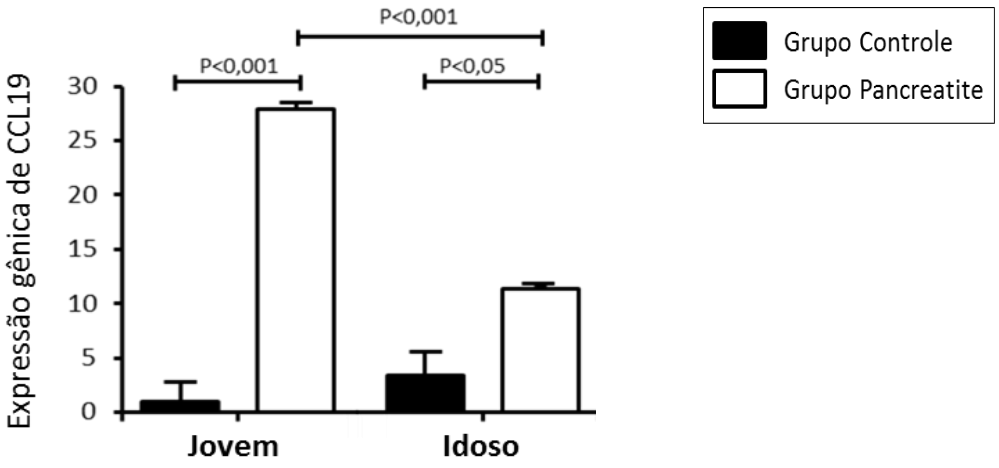

Figura 8 – Expressão de CCL19 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.

4.1.5 Expressão de CCL20

A quimiocina CCL20 mostrou níveis significativamente maiores em ratos idosos com PA comparados a ratos jovens com PA. Entre os grupos de animais com pancreatite houve uma expressão aumentada de CCL20 quando comparados com seus controles (Figura 9).

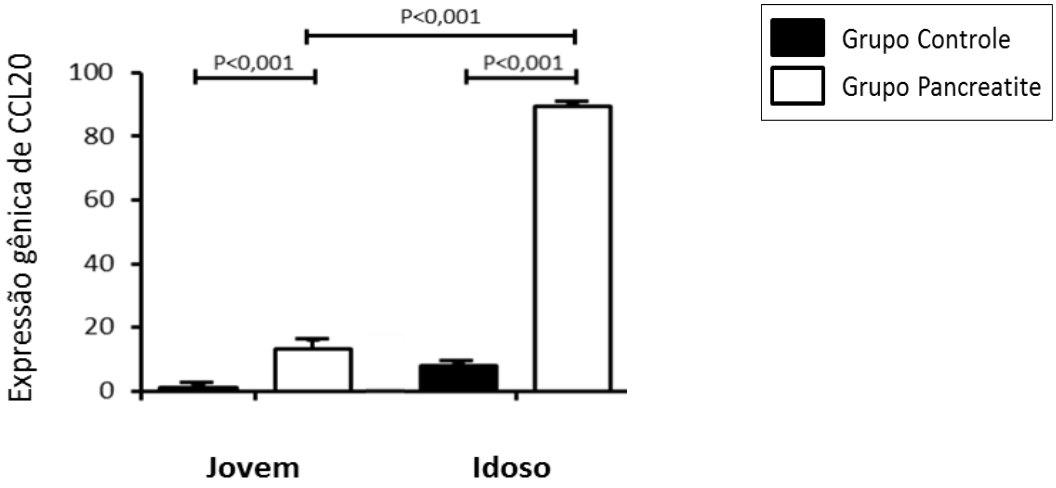

Figura 9 – Expressão de CCL20 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.

4.1.6 Expressão de CCL7

O nível da expressão gênica de CCL7 foi maior no grupo Pancreatite Jovem do que no Jovem Controle. Já em relação ao grupo com pancreatite, a expressão nos idosos foi estatisticamente menor do que nos jovens (Figura 10).

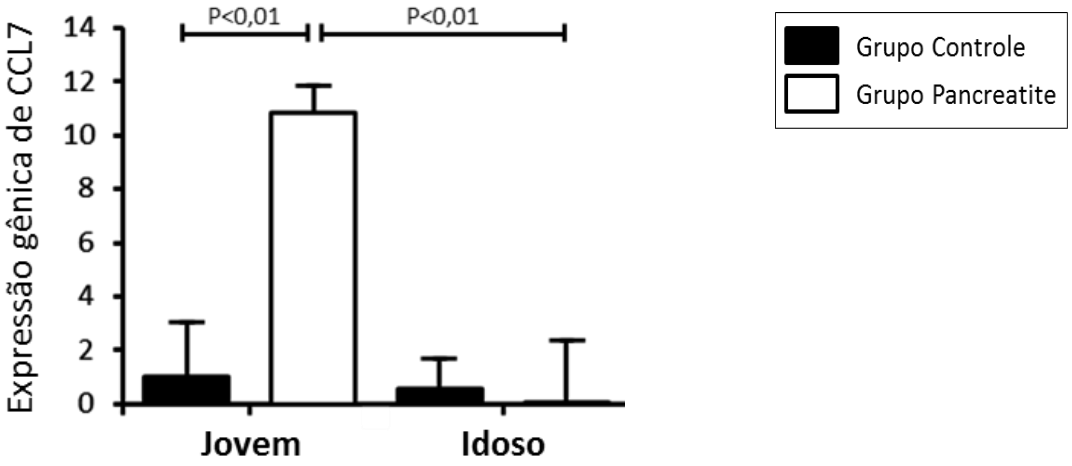

Figura 10 – Expressão de CCL7 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.

4.1.7 Expressão de CXCL1

O grupo Controle Idoso obteve expressão de CXCL1 estatisticamente significante maior em relação ao grupo Controle Jovem. O grupo Pancreatite Idoso obteve uma redução na expressão de CXCL1 estatisticamente significante quando comparado ao seu controle (Figura 11).

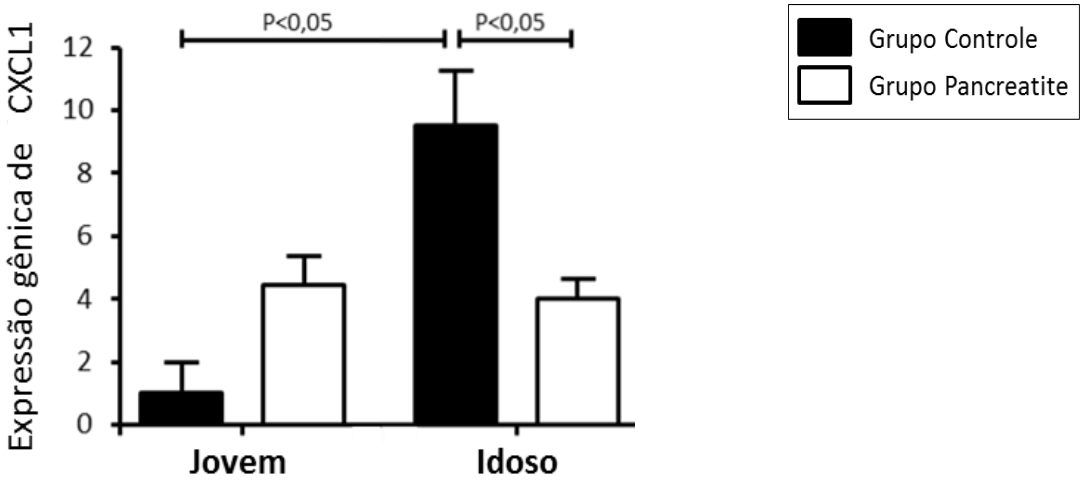

Figura 11 – Expressão de CXCL1 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.

4.1.8 Expressão de CXCL3

No grupo Pancreatite Idoso houve um aumento na expressão de CXCL3 quando comparado ao seu controle saudável (Figura 12).

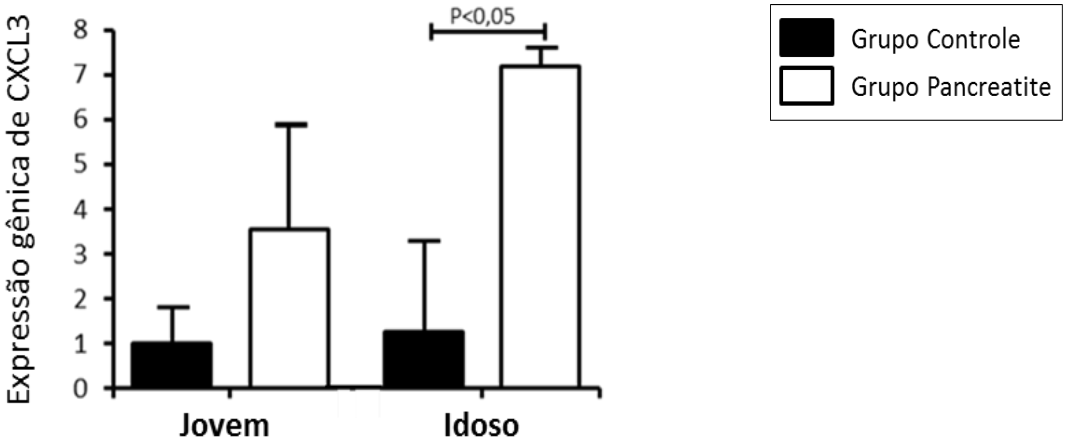

Figura 12 – Expressão de CXCL3 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.

4.1.9 Expressão de IL-10

Houve uma redução significativa na interleucina IL-10 no grupo Pancreatite Idoso quando comparado ao Controle Idoso. No entanto, no grupo Pancreatite Jovem houve um aumento na expressão de IL-10 comparado ao controle saudável. Em relação aos grupos com pancreatite, a expressão de IL-10 foi menor nos idosos do que nos jovens (Figura 13).

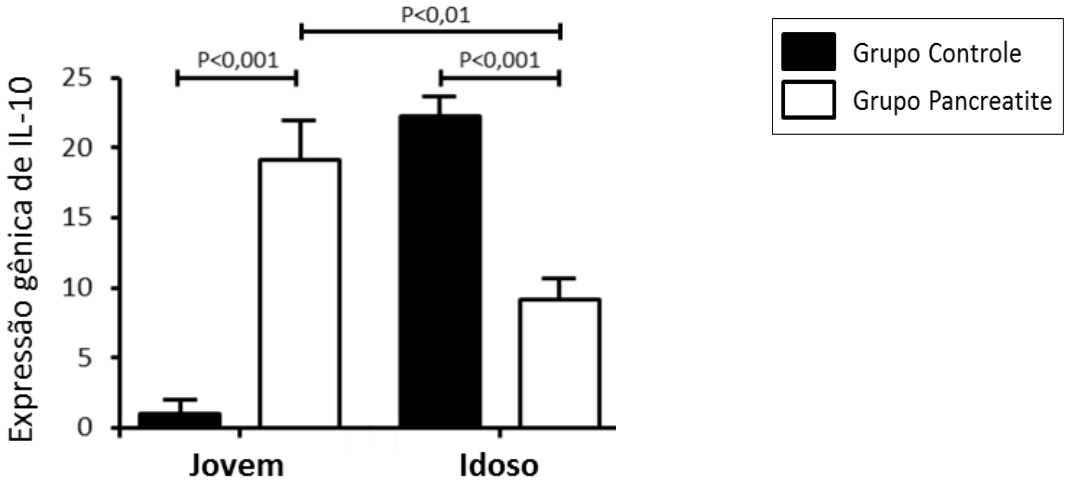

Figura 13 – Expressão de IL-10 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.

4.1.10 Expressão de IL-6

Houve um aumento significativo na expressão de IL-6 no grupo Pancreatite Jovem comparado ao seu controle saudável. Em relação aos grupos com pancreatite, a expressão de IL-6 foi menor nos idosos do que nos jovens (Figura 14).

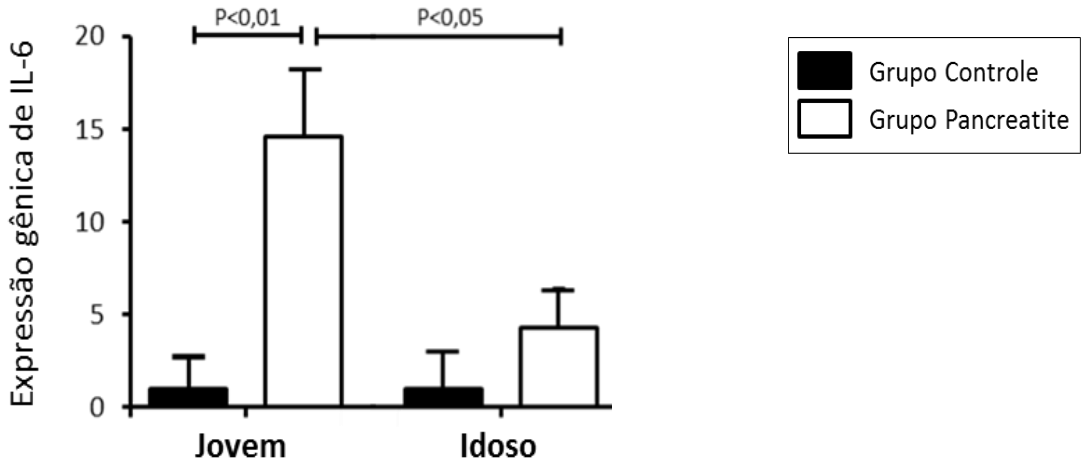

Figura 14 – Expressão de IL-6 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.

4.1.11 Expressão de TNF

Não houve diferenças estatísticas significantes nos níveis de TNF entre os grupos (Figura 15).

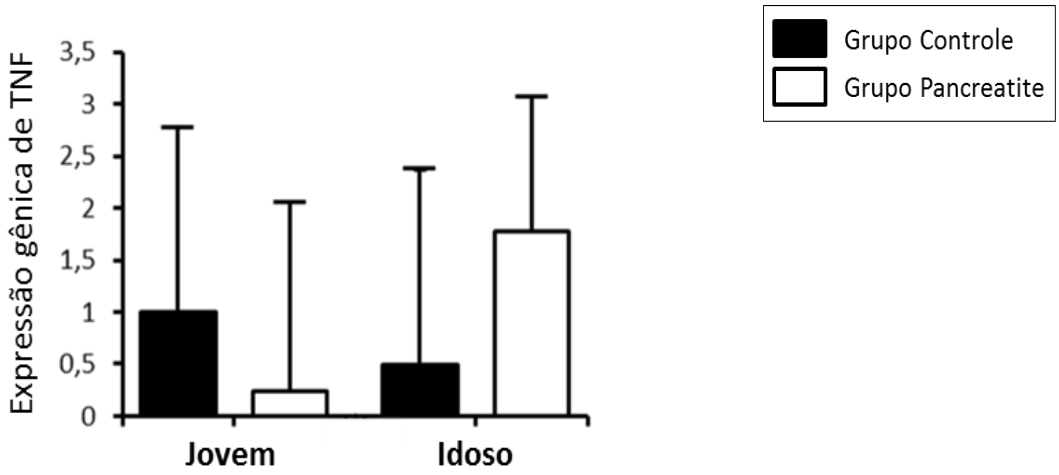

Figura 15 – Expressão de TNF no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.

4.1.12 Expressão de TNFRSF11b

O grupo Controle Idoso obteve expressão de TNFRSF11b estatisticamente significante maior em relação ao grupo Controle Jovem. O

grupo Pancreatite Idoso obteve uma redução na expressão de TNFRSF11b estatisticamente significante quando comparado ao seu controle (Figura 16).

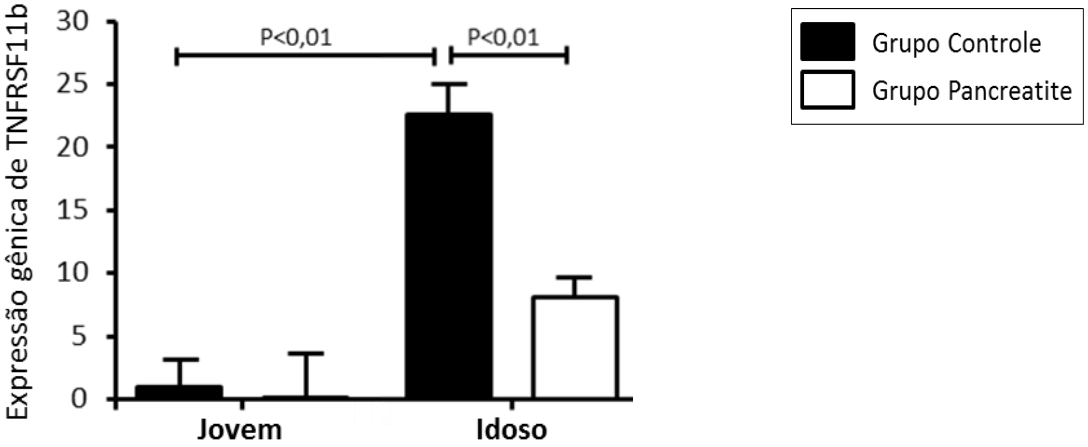

Figura 16 – Expressão de TNFRSF11b no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.

4.1.13 Expressão de TGFB2

A expressão de TGFB2 foi maior em ambos os grupos jovens e idosos com PA quando comparados com seus respectivos controles saudáveis (Figura 17).

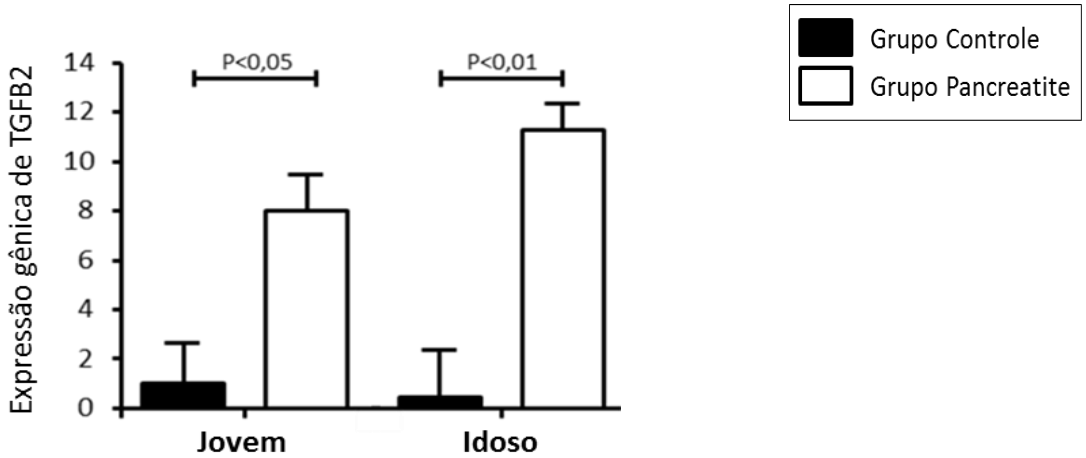

Figura 17 – Expressão de TGFB2 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.

4.1.14 Expressão de CSF2

O grupo Controle Idoso obteve expressão de CSF2 estatisticamente significante maior em relação ao grupo Controle Jovem. O grupo Pancreatite Idoso obteve uma redução na expressão de CSF2 estatisticamente significante quando comparado ao seu controle (Figura 18).

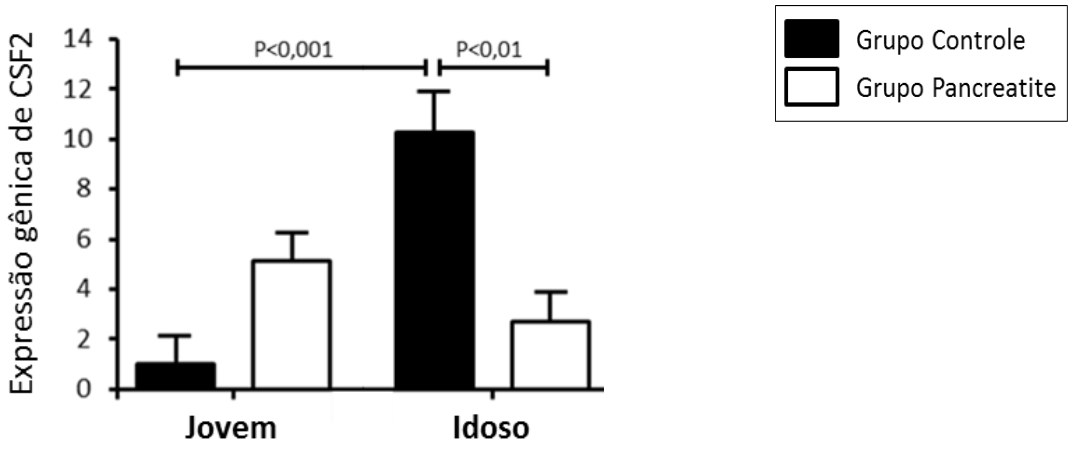

Figura 18 – Expressão de CSF2 no tecido cardíaco de ratos idosos e jovens submetidos ao modelo animal de Pancreatite Aguda e em controles saudáveis.

4.2 Análise histológica

Na análise histológica, a infiltração dos neutrófilos (Figura 19) foi significativamente maior no tecido cardíaco dos ratos jovens e idosos com PA, comparado com seus controles.

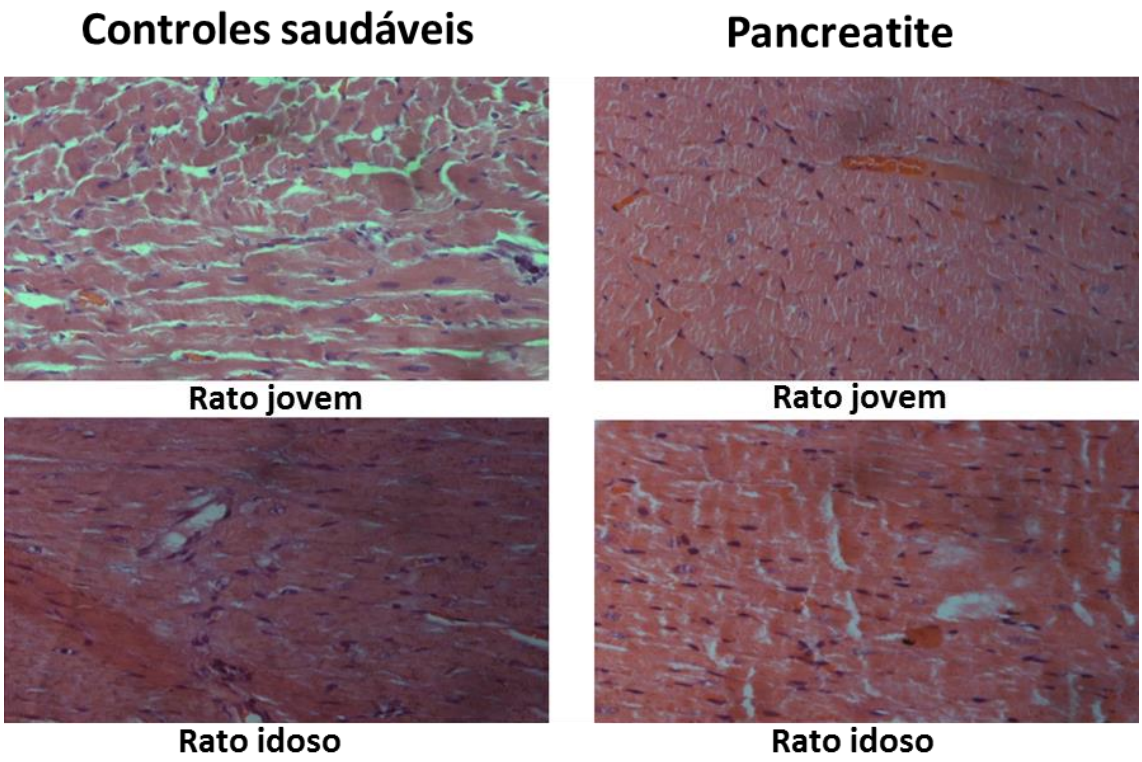

Figura 19 – Infiltração de neutrófilos no tecido cardíaco de ratos controles e com pancreatite.

A infiltração dos neutrófilos foi significativamente menor no grupo dos idosos com pancreatite quando comparado com os jovens com pancreatite como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Média do número de neutrófilos encontrados no tecido cardíaco**.**

Grupos	Média do número de neutrófilos no tecido cardíaco
Jovem controle	3
Idoso controle	4
Jovem com pancreatite	20
Idoso com pancreatite	11

5 DISCUSSÃO

Vários trabalhos demonstram que a pancreatite aguda no idoso é seguida de maior morbidade e mortalidade mesmo quando as lesões locais são semelhantes. Trabalhos experimentais e clínicos, no entanto, não demonstram diferenças importantes na resposta inflamatória sistêmica nos idosos. É possível, portanto que alterações específicas de determinados sistemas ou órgãos chaves sejam responsáveis pela maior morbidade e mortalidade nas pancreatites nos idosos. Com efeito, um trabalho experimental do nosso laboratório demonstrou um aumento de citocinas pró - inflamatórias e uma redução de citocinas anti-inflamatórias no íleo terminal de ratos idosos com pancreatite em relação aos ratos jovens com pancreatite, porém sem alteração dos níveis séricos. Estas alterações poderiam estar relacionadas a maior lesão intestinal e consequente maior translocação bacteriana e portanto maior gravidade da pancreatite aguda nos animais idosos[6]. A presença de maior inflamação intestinal associada a maior translocação bacteriana foi demonstrada em outro trabalho experimental de nosso laboratório[68].

Com respeito aos órgãos vitais cuja disfunção poderia aumentar a morbidade e a mortalidade nos idoso o coração representa um papel vital. Este órgão poderia ser afetado não só pelas citocinas circulantes associadas a pancreatite aguda[69] mas também pela produção local de citocinas no próprio coração como foi demonstrado recentemente[10]. Neste mesmo estudo, observou-se uma elevação significativa da expressão gênica de IL-6 no tecido miocárdico de ratos Wistar 2 horas após a pancreatite aguda experimental. Foram também observadas alterações estruturais cardíacas como degeneração vacuolar, picnose e perda de núcleo possivelmente relacionadas a produção local de citocinas no miocárdio[10].

Visto que inúmeros estudos têm sido realizados a fim de compreender o papel das citocinas no processo inflamatório desencadeado pela PA, decidimos investigar tanto a expressão gênica de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento durante a vigência da pancreatite aguda no tecido cardíaco e seus efeitos no rato idoso.

As quimiocinas pertencem a uma família de citocinas inflamatórias que controlam a quimiotaxia de leucócitos no tecido inflamado. A família de quimiocinas CC são quimioatrativas e ativadoras de monócitos e linfócitos, já a maioria das quimiocinas da família CXC atraem neutrófilos[14,46,49]. As quimiocinas podem ter outras propriedades biológicas, tais como a indução de proliferação celular e envolvimento durante a organogênese e cardiogênese[7]. Alguns estudos têm mostrado o papel das quimiocinas na patogênese de várias doenças cardíacas como a aterosclerose[70], miocardite[71], danos causados por reperfusão isquêmica do miocárdio[72] e insuficiência cardíaca, sugerindo um possível papel patogênico desses mediadores também na progressão da insuficiência cardíaca[73]. Quimiocinas têm sido consideradas importantes mediadoras da inflamação e na defesa do hospedeiro[14].

Um estudo na insuficiência cardíaca em fase terminal em humanos, mostrou expressão diminuída de quimiocinas no tecido do miocárdio. O ‘‘sistema de quimiocinas’’ pode representar um fator patogênico previamente não reconhecido no desenvolvimento da insuficiência cardíaca e pode introduzir uma nova família de mediadores com efeitos sobre o miocárdio[14].

Em nosso estudo, nos animais controles encontramos nos ratos idosos uma elevação na expressão gênica das quimiocinas CCL1, CCL11 e CXCL1, no fator de crescimento CSF2, nas citocinas C5 e IL-10 e no receptor de citocina TNFRSF11b, quando comparados com ratos jovens. Essa expressão aumentada nos ratos idosos saudáveis pode ser explicada pelo processo de imunossenescência, determinado pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, levando o idoso a um estado inflamatório crônico de baixo grau[74].

Após a indução da pancreatite aguda, esperávamos que os níveis dessas proteínas no coração aumentassem, já que alguns estudos mostram níveis elevados de citocinas circulantes associados com eventos cardiovasculares prejudiciais[9,10]. Além disso, níveis elevados de algumas citocinas podem ser utilizados como marcadores inflamatórios preditores independentes de eventos como insuficiência cardíaca congestiva e doença cardíaca coronária em idosos[75]. Contudo, curiosamente foi observada uma diminuição na expressão dessas mesmas quimiocinas e citocinas nos ratos

idosos com pancreatite quando comparados com o grupo de idosos controles, além do fator de crescimento CSF2 e o membro da superfamília do receptor de TNF (TNFRS11b), que também apresentaram diminuição na expressão gênica nos ratos idosos com pancreatite quando comparados com o grupo de idosos controles.

Entre os grupos com pancreatite, a expressão das quimiocinas CCL7 e CCL19, das citocinas IL-10 e IL-6 e a infiltração de neutrófilos foram menores nos corações dos animais idosos. A expressão de quimiocinas CCL19 e CCL20 aumentou no grupo pancreatite jovem comparado ao seu controle saudável e no grupo pancreatite idoso comparado ao controle idoso. Enquanto que a quimiocina CXCL3 aumentou somente nos animais idosos com PA quando comparado ao controle idoso. Já a expressão da quimiocina CCL7 aumentou somente no grupo pancreatite jovem.

Damas et al. verificou a expressão gênica de quimiocinas C, CC e CXC e seus receptores em pacientes com insuficiência cardíaca, níveis elevados na expressão de quimiocinas foram encontrados, apoiando um papel patogênico para quimiocinas na insuficiência cardíaca[76].

Em nosso estudo houve um aumento na expressão gênica de TGF-β2 em ambos grupos jovens e idosos com pancreatite quando comparados com seus respectivos controles, esse aumento pode estar relacionado com alterações cardíacas. Em um estudo experimental de hipertrofia cardíaca foi encontrado um aumento da expressão de TGF-β em ratos com constrição da aorta suprarrenal. TGF-β no interstício, especialmente em lugares onde fibroblastos demonstram atividade proliferativa, está associada com a indução de colágeno I e III e fibrose do miocárdio[77]. Kuwahara et al.[78] observaram que o TGF-β desempenha um papel chave na fibrose miocárdica em corações de ratos hipertensos através da ativação de fibroblastos.

Como mencionado anteriormente, Meyer et al.[10] mostraram elevação significativa da expressão gênica de IL-6 no tecido miocárdico de ratos 2 horas após a indução da PA. No nosso estudo, a expressão de IL-6, aumentou no grupo jovem com pancreatite quando comparado ao controle jovem corroborando com os resultados do autor.

De acordo com vários estudos, esperávamos que IL-12, TNF, IL-1b, IL-2, PF4 e MIF tivessem aumento na expressão gênica, porém não se observaram diferenças estatísticas, o que sugere que os níveis dessas interleucinas e o fator de necrose tumoral não apresentam alterações na expressão gênica no coração durante a vigência da PA.

Esses achados podem sugerir uma possível correlação entre alterações cardíacas e a gravidade da doença associada à senilidade.

A inflamação sistêmica gerada em decorrência da pancreatite aguda pode induzir um desequilíbrio homeostático levando ao dano tecidual local, podendo alcançar outros órgãos, tais como o intestino[6] e o pulmão[7]. Por outro lado, órgãos como o cérebro[8] têm mecanismos estruturais e celulares de proteção contra a inflamação. A diminuição da expressão gênica de citocinas e quimiocinas encontradas nos animais idosos com PA sugere que a inflamação sistêmica pode atuar de maneira singular sobre cada órgão. Desse modo, é possível que um mecanismo cardioprotetor durante a senilidade seja estabelecido na presença de PA.

Contudo, na literatura não há muitos relatos sobre a ação dessas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no coração durante a vigência da pancreatite aguda. Por tanto, esse estudo abre novas portas para a compreensão sobre o efeito protetor do coração na população senil em relação às doenças inflamatórias sistêmicas, tais como a pancreatite, porém, mais estudos são necessários para que se obtenha maior conhecimento e clareza sobre os assuntos tratados nesse estudo.

6 CONCLUSÃO

Com base em outros estudos feitos pelo nosso grupo, este estudo sugere que a inflamação sistêmica é compartimentada e tem características únicas, dependendo do órgão investigado. Neste modelo animal de pancreatite aguda, a expressão das quimiocinas CCL7 e CCL19, das citocinas IL-6 e IL-10 e a infiltração de neutrófilos foram menores nos corações dos animais idosos com PA comparados aos ratos jovens com PA. Além disso, a expressão das quimiocinas CCL1, CCL11 e CXCL1 foi significativamente reduzida em ratos idosos com PA quando comparados aos ratos idosos saudáveis. A redução destas quimiocinas nos ratos idosos sugere a presença de um mecanismo cardioprotetor e pode ser também uma das causas da redução na infiltração de leucócitos. A sinalização das quimiocinas pode representar um novo alvo terapêutico para proteger o coração durante a inflamação sistêmica, portanto merece mais estudo.

7 ANEXO

7.1 Tabela. *Fold change* de todas as proteínas analisadas.

	Fold Change (em comparação ao grupo controle)					
	Jovem PA		Idoso PA		Idoso Controle	
Gene	**Fold Change**	**p**	**Fold Change**	**p**	**Fold Change**	**p**
Adipoq	2,245	0,408	1,381	0,792	4,515	0,246
Bmp2	0,204	0,655	0,430	0,910	0,914	0,555
Bmp4	4,830	0,294	0,738	0,615	0,156	0,945
Bmp6	2,798	0,129	0,273	0,344	1,437	0,333
Bmp7	0,832	0,888	0,839	0,610	3,135	0,242
C5	0,738	0,650	0,618	0,372	11,364	0,086
Ccl1	0,232	0,387	0,056	0,280	16,592	0,246
Ccl11	0,391	0,561	0,791	0,658	8,420	0,255
Ccl12	0,638	0,680	0,217	0,319	2,841	0,489
Ccl17	1,205	0,810	0,607	0,278	1,297	0,455
Ccl19	27,848	0,072	11,376	0,465	3,362	0,317
Ccl2	3,630	0,248	0,044	0,173	0,366	0,530
Ccl20	13,193	0,221	89,472	0,127	7,971	0,324
Ccl21	0,427	0,284	0,506	0,112	5,078	0,277
Ccl22	0,391	0,337	0,128	0,155	0,242	0,254
Ccl24	1,074	0,894	0,191	0,490	0,909	0,392
Ccl3	0,827	0,305	0,017	0,074	0,066	0,231
Ccl4	0,386	0,498	0,010	0,042	0,267	0,590
Ccl5	0,885	0,664	0,390	0,043	3,241	0,268
Ccl7	10,840	0,224	0,060	0,122	0,549	0,073
Cd40lg	2,245	0,408	1,381	0,792	4,515	0,246
Cd70	6,027	0,490	0,182	0,225	1,868	0,604
Cntf	0,687	0,551	0,697	0,419	0,325	0,220
Csf1	3,987	0,291	0,067	0,261	0,167	0,423
Csf2	5,139	0,238	2,698	0,321	10,263	0,242
Csf3	6,746	0,148	1,800	0,531	4,515	0,246
Ctf1	1,305	0,852	0,452	0,133	0,971	0,387
Cx3cl1	2,062	0,309	0,561	0,246	1,241	0,305
Cxcl1	4,430	0,314	3,996	0,353	9,500	0,233
Cxcl10	0,976	0,294	0,156	0,300	0,961	0,835
Cxcl11	0,703	0,646	0,051	0,474	1,797	0,260
Cxcl12	0,784	0,543	0,155	0,015	0,773	0,596
Cxcl13	1,989	0,586	0,284	0,348	3,275	0,675
Cxcl16	0,579	0,446	0,875	0,403	0,636	0,735
Cxcl3	3,546	0,236	7,175	0,096	1,250	0,225
Cxcl9	0,508	0,529	0,139	0,091	0,146	0,071
Faslg	0,972	0,610	0,682	0,658	0,187	0,361
Gdf15	0,706	0,893	1,011	0,484	1,337	0,401
Gpi	1,956	0,268	0,744	0,459	0,917	0,906
Ifna2	0,422	0,671	2,420	0,717	2,301	0,292
Ifng	0,025	0,108	0,234	0,173	1,170	0,824
Il10	19,128	0,235	9,125	0,232	22,283	0,265
Il11	0,185	0,394	0,300	0,801	0,371	0,427
Il12a	0,370	0,395	0,170	0,345	0,496	0,670
Il12b	2,904	0,163	7,001	0,023	2,887	0,292
Il13	1,034	0,435	1,620	0,288	1,427	0,313
Il15	1,841	0,276	0,676	0,457	0,269	0,076
Il16	2,217	0,302	0,326	0,248	0,079	0,328
Il17a	3,905	0,157	1,381	0,792	4,515	0,246
Il17f	1,624	0,936	1,317	0,538	3,928	0,290
Il18	0,827	0,893	3,876	0,068	0,489	0,849
Il1a	0,142	0,328	0,132	0,317	0,155	0,313
Il1b	5,723	0,167	0,749	0,870	0,832	0,337
Il1rn	4,889	0,187	2,590	0,614	4,604	0,314
Il2	2,245	0,408	1,381	0,792	4,515	0,246
Il21	2,245	0,408	4,311	0,298	4,515	0,246
Il22	5,182	0,144	1,456	0,777	2,861	0,271
Il23a	4,814	0,228	1,252	0,776	0,190	0,294
Il24	2,636	0,243	0,393	0,261	3,992	0,297
Il27	1,816	0,619	0,977	0,438	3,436	0,249
Il3	2,697	0,962	3,926	0,369	5,529	0,282
Il4	0,883	0,531	0,741	0,385	1,777	0,773
Il5	1,393	0,732	1,305	0,758	2,802	0,280
Il6	14,566	0,231	4,236	0,482	0,965	0,712
Il7	0,119	0,185	0,563	0,762	0,628	0,509
Il9	1,789	0,540	1,100	0,455	3,597	0,261
Lif	0,655	0,507	0,142	0,333	0,824	0,501
Lta	2,075	0,922	0,916	0,390	4,217	0,306
Ltb	0,417	0,547	0,176	0,163	0,337	0,274
Mif	0,014	0,028	0,166	0,044	0,459	0,916
Mstn	2,245	0,408	1,381	0,792	6,224	0,286

Continua

Conclusão: Tabela. *Fold change* de todas as proteínas analisadas.

	Fold Change (em comparação ao grupo controle)					
	Jovem PA		Idoso PA		Idoso Controle	
Gene	**Fold Change**	**p**	**Fold Change**	**p**	**Fold Change**	**p**
Nodal	0,894	0,936	0,557	0,230	4,108	0,271
Osm	2,835	0,253	0,271	0,470	0,316	0,397
Pf4	0,575	0,515	2,793	0,316	0,346	0,284
Ppbp	0,255	0,322	0,546	0,454	0,513	0,716
Spp1	13,080	0,064	0,736	0,472	0,557	0,916
Tgfb2	8,006	0,401	11,247	0,251	0,447	0,593
Thpo	2,245	0,408	4,429	0,193	4,966	0,227
Tnf	0,237	0,303	1,774	0,371	0,495	0,364
Tnfrsf11b	0,035	0,493	8,121	0,957	22,597	0,258
Tnfsf10	2,331	0,150	0,620	0,479	0,065	0,047
Tnfsf11	0,518	0,285	0,216	0,128	1,417	0,371
Vegfa	2,810	0,356	0,893	0,377	0,701	0,772
Xcl1	1,205	0,617	0,265	0,546	1,497	0,752

8 REFERÊNCIAS*

1. Chen X, Ji B, Han B, Ernst SA, Simeone D, Logsdon CD. NF-κB activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response. *Gastroenterology*. 2002;122(2):448-57.

2. Cappell MS. Acute Pancreatitis: Etiology, Clinical Presentation, Diagnosis, and Therapy. *Medical Clinics of North America*. 2008;92(4):889-923.

3. Lankisch PG, Apte M, Banks PA. Acute pancreatitis. *The Lancet*. 2015;386(9988):85-96.

4. Zhang XP, Zhang J, Song QL, Chen HQ. Mechanism of acute pancreatitis complicated with injury of intestinal mucosa barrier. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2007;8(12):888-95.

5. Makhija R, Kingsnorth AN. Cytokine storm in acute pancreatitis. *J Hep Bil Pancr Surg*. 2002;9(4):401-10.

6. Cunha DM, Koike MK, Barbeiro DF, Barbeiro HV, Hamasaki MY, Coelho Neto GT, et al. Increased intestinal production of alpha-defensins in aged rats with acute pancreatic injury. *Exp Gerontol*. 2014;60:215-9.

7. Machado MC, da Silva FP, Coelho AM. Do Elderly Patients with Acute Pancreatitis Need a Special Treatment Strategy?. 2015.

8. Hamasaki MY, Barbeiro HV, Barbeiro DF, Cunha DM, Koike MK, Machado MC et al.: "Neuropeptides in the brain defense against distant organ damage". Journal of neuroimmunology 2016; 290: 33-35.

9. Flores-Arredondo JH, Garcia-Rivas G, Torre-Amione G. Immune modulation in heart failure: past challenges and future hopes. *Curr Heart Fail Rep*. 2011;8(1):28-37.

10. Meyer A, Kubrusly MS, Salemi VM, De Mendonca Coelho AM, Molan NA, Patzina RA, et al. Severe acute pancreatitis: a possible role of intramyocardial cytokine production. JOP: Journal of the pancreas. 2014;15(3):237-42.

---

*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. Machado MC, Coelho AM, Carneiro D'Albuquerque LA, Jancar S. Effect of ageing on systemic inflammatory response in acute pancreatitis. *Int J Inflam.* 2012;2012:270319.

12. Gotzinger P, Sautner T, Kriwanek S, Beckerhinn P, Barlan M, Armbruster C, et al. Surgical treatment for severe acute pancreatitis: extent and surgical control of necrosis determine outcome. *World J Surg*. 2002;26(4):474-8.

13. Santos JS, Elias Júnior J, Scarpelini S, Sankarankutty AK. Pancreatite aguda: atualização de conceitos e condutas*. Medicina(Ribeirão Preto)*. 2003;36:(2/4): 266-82.

14. Xin MJ, Chen H, Luo B, Sun JB. Severe acute pancreatitis in the elderly: etiology and clinical characteristics. *World J Gastroenterol*. 2008;14:2517–21.

15. Thoeni RF. The revised Atlanta classification of acute pancreatitis: its importance for the radiologist and its effect on treatment. *Radiology*. 2012;262(3):751-64.

16. Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, Gooszen HG, Johnson CD, Sarr MG, et al. Classification of acute pancreatitis–2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut*. 2013;62(1):102-11.

17. Refinetti RA, Martinez R. Pancreatite necro-hemorrágica: atualização e momento de operar. *ABCD Arq Bras Cir Dig*. 2010;23(2):122-127.

18. Lankisch PG, Weber-Dany B, Hebel K, Maisonneuve P, Lowenfels AB. The harmless acute pancreatitis score: a clinical algorithm for rapid initial stratification of nonsevere disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7(6):702-5; quiz 607.

19. Chebli JM, Chebli LA, Ricci Júnior JER, Ferreira GD, Godinho BRB, Delgado AHA, et al. Abordagem moderna da pancreatite aguda. *Revista Eletrônica Acervo Saúde.* 2014;6(2):683-95.

20. Ince AT, Baysal B. Pathophysiology, classification and available guidelines of acute pancreatitis. *Turk J Gastroenteroly*. 2014;25(4):351-7.

21. Stevenson K, Carter CR. Acute pancreatitis. *Surgery (Oxford).* 2013;31(6):295-303.

22. Huang H, Liu Y, Daniluk J, Gaiser S, Chu J, Wang H, et al. Activation of nuclear factor-kappaB in acinar cells increases the severity of pancreatitis in mice. *Gastroenterology*. 2013;144(1):202-10.

23. Norman Md J. The Role of Cytokines in the Pathogenesis of Acute Pancreatitis. *The American Journal of Surgery.* 1998;175(1):76-83.

24. Nedoszytko B, Sokolowska-Wojdylo M, Ruckemann-Dziurdzinska K, Roszkiewicz J, Nowicki RJ. Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. *Postepy Dermatol Alergol*. 2014;31(2):84–91.

25. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001;357(9270):1777-89.

26. 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.

27. Heath DI, Cruickshank A, Gudgeon M, Jehanli A, Shenkin A, Imrie CW. Role of interleukin-6 in mediating the acute phase protein response and potential as an early means of severity assessment in acute pancreatitis. *Gut*. 1993;34(1):41-5.

28. 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.

29. Bhatia M, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis. *Current opinion in investigational drugs*. 2001;2(4):496-501.

30. 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.

31. 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.

32. Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2003;14(5):361-8.

33. Sennello JA, Fayad R, Pini M, Gove ME, Ponemone V, Cabay RJ, et al. Interleukin-18, together with interleukin-12, induces severe acute pancreatitis in obese but not in nonobese leptin-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(23):8085-90.

34. Schneider A, Haas SL, Hildenbrand R, Siegmund S, Reinhard I, Nakovics H, et al. Enhanced expression of interleukin-18 in serum and pancreas of patients with chronic pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology* : *WJG.* 2006;12(40):6507-14.

35. Talukdar R, Swaroop Vege S. Early management of severe acute pancreatitis. *Curr Gastroenterol Rep*. 2011;13(2):123-30.

36. Beger HG, Rau B, Mayer J, Pralle U. Natural course of acute pancreatitis. *World journal of surgery*. 1997;21(2):130-5.

37. Sakorafas GH, Tsiotou AG. Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis: current concepts. *Journal of clinical Gastroenterology*. 2000;30(4):343-56.

38. Bhatia M. Inflammatory response on the pancreatic acinar cell injury. Scand J Surg. 2005;94(2):97-102.

39. 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.

40. 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. *Am J Surg*. 1996;171(2):274-80.

41. Akinosoglou K, Gogos C. Immune-modulating therapy in acute pancreatitis: fact or fiction. *World J Gastroenterol*. 2014;20(41):15200-15.

42. Rongione AJ, Kusske AM, Reber HA, Ashley SW, McFadden DW. Interleukin-10 reduces circulating levels of serum cytokines in experimental pancreatitis. *J Gastrointest* Surg. 1997;1(2):159-65.

43. 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.

44. Kylänpää M-L. Inflammation and immunosuppression in severe acute pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology*. 2010;16(23):2867.

45. Lau EK, Allen S, Hsu AR, Handel TM. Chemokine-receptor interactions: GPCRs, glycosaminoglycans and viral chemokine binding proteins. *Adv Protein Chem*. 2004;68:351-91.

46. Juhn SK, Jung MK, Hoffman MD, Drew BR, Preciado DA, Sausen NJ, et al. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of otitis media and sequelae. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2008;1(3):117-38.

47. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:787-820.

48. Abbas AK, Janeway CA Jr. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell*. 2000;100(1):129-38.

49. Frederick MJ, Clayman GL. Chemokines in cancer. *Expert Reviews in Molecular Medicine.* 2001;3(19):1-18.

50. Yang BM, Demaine AG, Kingsnorth A. Chemokines MCP-1 and RANTES in isolated rat pancreatic acinar cells treated with CCK and ethanol in vitro. *Pancreas.* 2000;21(1):22-31.

51. Blinman T, Gukovskaya A, Gukovsky I, Zaninovic V, Livingston E, Pandol SJ. Pancreatic acinar cells express IL-6, KC, MCP-1, and MIP-2: Evidence from RT-PCR analysis of microscopically isolated acinar cells. *Gastroenterology*. 1998;114: A443.

52. Grady T, Liang P, Ernst SA, Logsdon CD. Chemokine gene expression in rat pancreatic acinar cells is an early event associated with acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 1997;113(6):1966-75.

53. Seino Y, Ikeda U, Sekiguchi H, Morita M, Konishi K, Kasahara T, et al. Expression of leukocyte chemotactic cytokines in myocardial tissue. *Cytokine*. 1995;7(3):301-4.

54. Wang X, Aiyar N, Coatney RW, Li X, Koster P, Angermann CE, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 is upregulated in rats with volume-overload congestive heart failure. *Circulation*. 2000;102(11):1315-22.

55. Antonucci E, Fiaccadori E, Donadello K, Taccone FS, Franchi F, Scolletta S. Myocardial depression in sepsis: from pathogenesis to clinical manifestations and treatment. *J Crit Care*. 2014;29(4):500-11.

56. Landesberg G, Levin PD, Gilon D, Goodman S, Georgieva M, Weissman C, et al. Myocardial Dysfunction in Severe Sepsis and Septic Shock: No Correlation

With Inflammatory Cytokines in Real-life Clinical Setting. *Chest*. 2015;148(1):93-102.

57. Bassi C, Butturini G, Falconi M, Salvia R, Frigerio I, Pederzoli P. Outcome of open necrosectomy in acute pancreatitis. *Pancreatology.* 2003;3(2):128-32.

58. 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.

59. Sun B, Li HL, Gao Y, Xu J, Jiang HC. Factors predisposing to severe acute pancreatitis: evaluation and prevention. *World J Gastroenteroly*. 2003;9(5):1102-5.

60. Capurso G, Zerboni G, Signoretti M, Valente R, Stigliano S, Piciucchi M, et al. Role of the gut barrier in acute pancreatitis. *J Clin Gastroenteroly*. 2012;46(Suppl):S46-51.

61. Leong J, Zhou M, Jacob A, Wang P. Aging-related hyperinflammation in endotoxemia is mediated by the alpha2A-adrenoceptor and CD14/TLR4 pathways. *Life Sci*. 2010;86(19-20):740-6.

62. 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. *Clin Immunol.* 2013;148(2):198-205.

63. Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(4):507-13.

64. 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(1):244-54.

65. Norton ID, Clain JE. Optimising outcomes in acute pancreatitis. Drugs. 2001;61(11):1581-91.

66. Isenmann R, Rau B, Zoellner U, Beger HG. Management of Patients with Extended Pancreatic Necrosis. *Pancreatology*. 2001;1(1):63-8.

67. 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 J Gastroenteroly.* 2012;18(26):3379-88.

68. Barbeiro DF, Koike MK, Coelho AM, Pinheiro da Silva F, César Machado MC. Intestinal barrier dysfunction and increased COX-2 gene expression in the gut of elderly rats with acute pancreatitis. *Pancreatology*. 2016;16(1):52-6.

69. Hughes CB, Henry J, Kotb M, Lobaschevsky A, Sabek O, Gaber AO. Up-Regulation of TNFα mRNA in the Rat Spleen Following Induction of Acute Pancreatitis. *Journal of Surgical Research.* 1995;59(6):687-93.

70. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 1998;394(6696):894-7.

71. Kolattukudy PE, Quach T, Bergese S, Breckenridge S, Hensley J, Altschuld R, et al. Myocarditis induced by targeted expression of the MCP-1 gene in murine cardiac muscle. *Am J Pathol.* 1998;152(1):101-11.

72. Kukielka GL, Youker KA, Michael LH, Kumar AG, Ballantyne CM, Smith CW, et al. Role of early reperfusion in the induction of adhesion molecules and cytokines in previously ischemic myocardium. *Mol Cell Biochem.* 1995;147(1-2):5-12.

73. Damas JK, Gullestad L, Ueland T, Solum NO, Simonsen S, Froland SS, et al. CXC-chemokines, a new group of cytokines in congestive heart failure-possible role of platelets and monocytes. *Cardiovasc Res*. 2000;45(2):428-36.

74. Michaud M, Balardy L, Moulis G, Gaudin C, Peyrot C, Vellas B, et al. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. J Am Med Dir Assoc. 2013 Dec;14(12):877-82.

75. Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, et al. Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation*. 2003;108(19):2317-22.

76. Damas JK, Gullestad L, Aass H, Simonsen S, Fjeld JG, Wikeby L.Enhanced gene expression of chemokines and their corresponding receptors in mononuclear blood cells in chronic heart failure--modulatory effect of intravenous immunoglobulin. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38(1):187-93.

77. Kai H, Kuwahara F, Tokuda K, Imaizumi T. Diastolic dysfunction in hypertensive hearts: roles of perivascular inflammation and reactive myocardial fibrosis. Hypertens Res. 2005; 28(6):483-90.

78. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K et al. Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis

and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. Circulation. 2002; 106(1):130-5.

MEDICINA
USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 09/10/2014**, APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **141/14** intitulado**: "Acometimento cardíaco em ratos idosos submetidos ao modelo de pancreatite aguda"** que utilizará **90** animais da espécie **rato**, apresentado pelo Departamento de Clínica Médica.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Fabiano Pinheiro da Silva
Pesquisador (a) Executante: Rizia Callou Amaral

CEUA-FMUSP, 09 de Outubro de 2014

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

DECREASE OF CC-FAMILY CHEMOKINES LEVELS IN THE HEART TISSUE OF AGED RATS FOLLOWING SEVERE ACUTE PANCREATITIS: A NEW MECHANISM OF HEART PROTECTION DURING SYSTEMIC INFLAMMATION?

Rízia Callou Amaral [a], Denise Frediani Barbeiro [a], Marcia Kiyomi Koike [a], Charles Mady [b], Marcel Cerqueira César Machado, [a] Fabiano Pinheiro da Silva [a,*]

[a]*Emergency Medicine Department, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil* [b]*Heart Institute, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil*

Running title: Reduced neutrophil infiltration in aged rat AP hearts

Keywords: Chemotaxis; Inflammation; Acute pancreatitis; Heart

* **Corresponding author:** Fabiano Pinheiro da Silva, MD, PhD, 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.

Tel.: +55 11 3061 8480; fax: +55 11 3061 8480.

E-mail address: pinheirofabiano@hotmail.com (F. Pinheiro da Silva).

ABSTRACT

Background/Objectives: We sought to investigate the effect of systemic inflammation on the gene expression of cytokines, chemokines, and growth factors in the hearts of older and younger rats in an animal model of acute pancreatitis (AP).

Methods: AP was induced in all rats by injection of 0.1 ml/100 g body weight taurocholate. There were two healthy age-matched control groups. An array of 79 cytokines, chemokines, and growth factors were measured in samples of cardiac tissue taken from the AP rats after 10 hours, and from control rats. Neutrophil counts in samples were examined.

Results: Older healthy rats had significantly higher levels of CXCL1, CCL1, and CCL11 expression than younger ones ($P < 0.05$). CCL7 and CCL19 expression was significantly higher in older than in younger healthy rats, and in AP rats than in their respective controls ($P < 0.05$). However, CCL7 and CCL19 expression was significantly lower in older AP rats than in younger ones ($P < 0.05$). There was significantly more neutrophil infiltration in the hearts of both younger and older AP rats than in those of the respective controls, but neutrophil infiltration was significantly lower in the older AP rats.

Conclusions: This study indicates that systemic inflammation may show unique features for different organs in the body. CCL7 and CCL19 expression, and neutrophil infiltration, were lower in hearts of older AP rats than younger ones, suggesting a possible cardioprotective mechanism in older animals with systemic inflammation.

Introduction

Acute pancreatitis (AP) is a disease characterized by local and systemic inflammation, and its severe form is associated with high morbidity and mortality rates [1]. Advanced AP is characterized by infected necrosis and can lead to the involvement of distant organs and the development of multiple organ dysfunction [2,3]. AP has various etiological factors, the most common of which are gallstones and excess alcohol consumption, which together represent 75% of cases [4]. Regardless of the initial mechanism, the inflammatory process is triggered by injury to the pancreatic acinar cells, leading to recruitment of immune cells and production of molecules such as cytokines and chemokines, which play an important role in the pathogenesis of this disease [5]. Pancreatic inflammation induces profound disturbances in homeostasis, leading to tissue injury in other organs such as the intestines [6]. On the other hand, organs such as the brain [7] have structural and cellular mechanisms of protection against inflammation, and neurologic manifestations of this disease are rare. What about the heart?

It has been described that patients with heart failure exhibit cardiac injury, leading to the production of a variety of pro-inflammatory cytokines, activation of T cells, formation of autoantibodies, and activation of the complement system [8]. This suggests that a robust innate immune response can also be activated in the heart, so we hypothesized that the heart could display cardioprotective mechanisms during systemic inflammation. We have previously demonstrated that the intensity of systemic inflammation associated with AP is similar in young and old rats, but that, the duration of systemic inflammation is much longer in older animals. It was found that older rats had more severe intestinal injury and, as a consequence, there was greater bacterial translocation, leading to prolonged systemic infection, multiple organ failure, and higher mortality [6]. Advanced age is considered to be an independent prognostic factor for a poorer prognosis in AP, but the mechanisms involved are not fully understood [9].

The aim of the present study was to investigate the effect of systemic inflammation on the heart, and to determine whether the effects are modified with age. Thus, we analyzed the gene expression of 79 cytokines, chemokines, and growth factors in elderly and young rat hearts in an animal model of AP.

Materials and methods

Animal model of acute pancreatitis

The experiments were performed at the Emergency Medicine Department (LIM-51 - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) and at the Heart Institute (InCor - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo). The Protocol was approved by the Ethics Committee on the use of animals (Protocol # 141/14).

Male Wistar rats, either young (8 weeks) from 200 g to 350 g body weight, or aged (18 months) from 600 g to 850 g, were divided into the following groups: young animals with induced pancreatitis (n = 4); young animal controls (n = 6); elderly animals with induced pancreatitis (n = 5); and elderly animal controls (n = 5). AP was induced by the retrograde injection of 0.5 mL of 2.5% sodium taurocholate (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) directly into the pancreatic duct at a constant infusion rate using a pump]. Since we found in a pilot study that rat pancreas weight did not increase with age; we used the same amount of sodium taurocholate in young and elderly rats.

After 10 hours, rats were euthanized, hearts were perfused with saline and samples of cardiac tissue were collected and stored at −80 °C for later analysis. (n = 8); and Old Control (n = 10).

Analysis of gene expression

Total RNA was isolated from cardiac tissue according to the standard protocol for extraction using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA). Quantification of RNA extracted from cardiac tissue was carried out spectrophotometrically at 260 nm in NanoVue™ Plus equipment (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) and the A260/A280 ratio was determined. The polymerase chain reaction (PCR) kit Array (RT^2 First Strand Kit-Rat Cytokines & Chemokines) was used to analyze the cytokines, chemokines, and growth factors that are listed in **Table 1**, following the protocols of cDNA synthesis and real-time PCR according to the manufacturer's recommendations. Subsequently, samples were subjected to PCR Step One (Applied Biosystems Carlsbad, CA, USA). Data were analyzed using the RT^2 Profiler PCR Array Data Analysis Web-based Portal, to obtain the B2m and Rplp1 genes as housekeeping genes.

Histology

The heart was washed with saline solution and fixed with 10% formaldehyde buffered solution. The equatorial portion of the ventricles were placed in paraffin and 5-μm-thick histological sections were obtained and mounted on glass slides. The area of the left ventricle wall was determined using hematoxylin-eosin (HE) staining. Histomorphometric measurements were performed using a computerized system (Nis Element Software, Nikon, Tokyo, Japan). Thirty microscopic fields were considered for analysis in the histological sections. To estimate the inflammatory response, the number of HE-stained neutrophils was counted per section.

Statistical analysis

The characteristics of AP rats and controls were compared using the Kruskall-Wallis or Mann-Whitney *U* test, as appropriate. A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant. The analysis was performed using GraphPad InStat 3 software (GraphPad InStat Inc., San Diego, CA, USA).

.

Results

Among the cytokines studied, there was a significant reduction in interleukin (IL)-6 and IL-10 in the heart tissue of aged AP rats compared with young AP rats (Fig. 1B, C). There were no significant differences between the study groups in tumor necrosis factor (TNF)-α levels (Fig. 1A) or in any other cytokines investigated (data not shown).

The chemokines CCL7 and CCL19 showed significantly lower levels in heart tissue of aged AP rats compared with young AP rats ($P < 0.01$; Fig. 2D,F). In healthy rats, aged animals exhibited significantly higher levels of CXCL1, CCL1, CCL11 (Fig. 2A, C, E) and IL-10 ($P < 0.01$; Fig. 1C) compared with young controls. Interestingly, CXCL1, CCL1 and CCL11 levels reduced in older rats after pancreatic injury (Fig 2A, C, E). Members of the TNF receptor superfamily, growth factors, and

other inflammatory mediators investigated showed no differences between aged and young healthy or AP animals.

In histological analysis, HE staining indicated that there were significantly more neutrophils in the heart tissue of AP rats, both young and old, compared with their controls. However, there were significantly fewer neutrophils in elderly AP rats compared with young AP rats (Table 2).

Discussion

Recent studies have indicated that older adults have elevated levels of pro-inflammatory cytokines and acute phase reactants in the steady state [10-12]. In the current study, CXCL1, CCL1, and CCL11 gene expression was upregulated in healthy aged rats compared with young rats, as a sign of inflammation in this population. In aged AP rats, these chemokines were promptly downregulated. We suggest this represents a mechanism of cardioprotection in the aged animals with induced AP.

Several studies have shown that AP in elderly patients leads to greater morbidity and mortality. Experimental studies and clinical trials, however, do not show marked changes in the systemic inflammatory response in the elderly with major clinical diseases, such as AP or septic shock [13]. It is possible that specific changes at the local level in key organs are responsible for the greater morbidity and mortality in the elderly with AP. Experimental work in our laboratory showed an increase in pro-inflammatory cytokines and a reduction in anti-inflammatory cytokines in the terminal ileum of elderly rats with pancreatitis compared with young rats with pancreatitis, although there were no detectable differences in serum levels [6]. It is possible that the heart could be affected, not only by circulating cytokines associated with AP [14], but also by local production of cytokines, as was recently demonstrated by Meyer et al. [15]. In that study, the authors observed a significant elevation of IL-6 gene expression in the myocardial tissue of Wistar rats, 2 hours after experimental AP was induced. Cardiac structural changes were also found, including vacuolar degeneration, pyknosis, and core tissue loss, and were associated with local production of cytokines in the myocardium [15].

In the current study, we found decreased levels of CCL7 and CCL19 in the heart tissue of aged AP rats compared with young AP rats. Thus, we believe that chemokine signaling could be modified in the aged AP animals to protect the heart against overt inflammation. Indeed, histologic analysis confirmed that neutrophil infiltration was lower in aged AP rat hearts than in the young AP rat hearts.

Neutrophils are one of the earliest cells targeted by the chemokines during acute inflammation. In support of our observations, Damas et al. found increased levels of chemokines CC and CXC and their receptors in patients with heart failure, suggesting a pathogenic role for chemokines in chronic heart failure [16].

Chemokines belong to a family of inflammatory cytokines that control the chemotaxis of leukocytes into inflamed tissue. They form a sophisticated communication system to chemo-attract all immune cells. Chemokines are classified independent of their function, but based on their amino acid composition, specifically on the presence of a conserved tetra-cysteine motif [17]. There are two major subclasses: CXC and CC chemokines. We now know that this complex system of approximately 50 chemokines and 20 G protein-coupled, seven-transmembrane signaling receptors is also important in adaptive immunity [18,19]. The chemokines also participate in other biological events, such as cell proliferation, organogenesis, and cardiogenesis [20]. Some studies have shown involvement of chemokines in the pathogenesis of various heart diseases, such as atherosclerosis [21], myocarditis [22], and ischemic reperfusion injury [23], suggesting a possible pathogenic role of these mediators in the progression to heart failure [24]. Chemokines have been considered important mediators of inflammation and host defense [20]. Thus, the chemokine system may represent a previously unrecognized pathogenic factor in the development of heart disease, and may be a family of mediators with detrimental effects on the myocardium [20].

Conclusions

Systemic inflammation has been erroneously regarded as a uniform process characterized by a cytokine storm that elicits a state of overall inflammation in the body. This study indicates that systemic inflammation is compartmentalized and has unique features, depending on the organ investigated. In this rat model of AP, the expression of the chemokines, CCL7 and CCL19, and also neutrophil infiltration were lower in the hearts of aged AP animals compared with young AP rats, These findings associated with reduction of CXCL1,CCL1 and CCL11 chemokines gene expression in aged rats after induction of acute pancreatitis suggest the presence of a cardioprotective mechanism in the older animals. Chemokine signaling may represent a novel therapeutic target to protect the heart in systemic inflammation and deserves further study.

Conflict of Interest

The authors have no financial or ethical conflicts of interest.

REFERENCES

[1] Bhatia M, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis. Curr Opin Investig Drugs 2001;2:496–501.

[2] Lankisch PG, Apte M, Banks PA. Acute pancreatitis. Lancet 2015;386:85–96.

[3] Zhang XP, Zhang J, Song QL, Chen HQ. Mechanism of acute pancreatitis complicated with injury of intestinal mucosa barrier. J Zhejiang Univ Sci B 2007;8:888–95.

4 Cappell MS: Acute pancreatitis: Etiology, clinical presentation, diagnosis, and therapy. The Medical clinics of North America 2008; 92: 889-923, ix-x.

5 Makhija R, Kingsnorth AN: Cytokine storm in acute pancreatitis. Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery 2002; 9: 401-410.

6 Cunha DM, Koike MK, Barbeiro DF, Barbeiro HV, Hamasaki MY, Coelho Neto GT et al.: Increased intestinal production of alpha-defensins in aged rats with acute pancreatic injury. Experimental gerontology 2014; 60: 215-219.

7 Hamasaki MY, Barbeiro HV, Barbeiro DF, Cunha DM, Koike MK, Machado MC et al.: "Neuropeptides in the brain defense against distant organ damage". Journal of neuroimmunology 2016; 290: 33-35.

8 Flores-Arredondo JH, Garcia-Rivas G, Torre-Amione G: Immune modulation in heart failure: Past challenges and future hopes. Current heart failure reports 2011; 8: 28-37.

9 Machado MC, Coelho AM, Carneiro D'Albuquerque LA, Jancar S: Effect of ageing on systemic inflammatory response in acute pancreatitis. International journal of inflammation 2012; 2012: 270319.

10 Grubeck-Loebenstein B, Wick G: The aging of the immune system. Advances in immunology 2002; 80: 243-284.

11 Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR: Age-dependent dysregulation of innate immunity. Nature reviews Immunology 2013; 13: 875-887.

12 Plackett TP, Boehmer ED, Faunce DE, Kovacs EJ: Aging and innate immune cells. Journal of leukocyte biology 2004; 76: 291-299.

13 Pinheiro da Silva F, Zampieri FG, Barbeiro DF, Barbeiro HV, Goulart AC, Torggler Filho F et al.: Septic shock in older people: A prospective cohort study. Immunity & ageing : I & A 2013; 10: 21.

14 Hughes CB, Henry J, Kotb M, Lobaschevsky 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: 687-693.

15 Meyer A, Kubrusly MS, Salemi VM, De Mendonca Coelho AM, Molan NA, Patzina RA et al.: Severe acute pancreatitis: A possible role of intramyocardial cytokine production. JOP : Journal of the pancreas 2014; 15: 237-242.

16 Damas JK, Gullestad L, Aass H, Simonsen S, Fjeld JG, Wikeby L et al.: Enhanced gene expression of chemokines and their corresponding receptors in mononuclear blood cells in chronic heart failure--modulatory effect of intravenous immunoglobulin. Journal of the American College of Cardiology 2001; 38: 187-193.

17 Rot A, von Andrian UH: Chemokines in innate and adaptive host defense: Basic chemokinese grammar for immune cells. Annual review of immunology 2004; 22: 891-928.

18 Griffith JW, Sokol CL, Luster AD: Chemokines and chemokine receptors: Positioning cells for host defense and immunity. Annual review of immunology 2014; 32: 659-702.

19 Allen SJ, Crown SE, Handel TM: Chemokine: Receptor structure, interactions, and antagonism. Annual review of immunology 2007; 25: 787-820.

20 Damas JK, Eiken HG, Oie E, Bjerkeli V, Yndestad A, Ueland T et al.: Myocardial expression of cc- and cxc-chemokines and their receptors in human end-stage heart failure. Cardiovascular research 2000; 47: 778-787.

21 Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF: Decreased lesion formation in ccr2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. Nature 1998; 394: 894-897.

22 Kolattukudy PE, Quach T, Bergese S, Breckenridge S, Hensley J, Altschuld R et al.: Myocarditis induced by targeted expression of the mcp-1 gene in murine cardiac muscle. The American journal of pathology 1998; 152: 101-111.

23 Kukielka GL, Youker KA, Michael LH, Kumar AG, Ballantyne CM, Smith CW et al.: Role of early reperfusion in the induction of adhesion molecules and cytokines in previously ischemic myocardium. Molecular and cellular biochemistry 1995; 147: 5-12.

24 Damas JK, Gullestad L, Ueland T, Solum NO, Simonsen S, Froland SS et al.: Cxc-chemokines, a new group of cytokines in congestive heart failure--possible role of platelets and monocytes. Cardiovascular research 2000; 45: 428-436.

Figure Legends

Fig. 1. Gene expression of TNFα (A), IL-6 (B) and IL-10 (C), in the heart tissue of young and old rats subjected to an animal model of acute pancreatitis compared to healthy controls. TNF: tumor necrosis factor; IL: interleukin.

Fig. 2. Gene expression of CXCL1 (A), CXCL3 (B), CCL1 (C), CCL7 (D), CCL11 (E), CCL19 (F) and CCL20 (G) in the heart tissue of young and old rats subjected to an animal model of acute pancreatitis compared with healthy controls.

TABLES

Table 1

Cytokine, chemokine, and growth factor genes analyzed in this study.

Chemokines				
CCL1	CCL11	CCL12	CCL17	CCL19
CCL12	CCL20	CCL21	CCL22	CCL24
CCL13	CCL14	CCL15	CCL7	CX3CL1
CXCL1	CXCL10	CXCL11	CXCL12	CXCL13
CXCL16	CXCL3	CXCL9	PF4	PPBP
CXCL1				
Interleukins				
IL-10	IL-11	IL-12a	IL-12β	IL-13
IL-15	IL-16	IL-17a	IL-17f	IL-18
IL-1a	IL-1β	IL-RN	IL-2	IL-21
IL-22	IL-23a	IL-24	IL-27	IL-3
IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-9
Interferons				
IFN-α2	IFN-g			
Growth factors				
BMP-2	BMP-4	BMP-6	BMP-7	CNTF
CSF-1	CSF-2	CSF-3	GP-1	LIF
MSTN	NODAL	OSM	THPO	VEGFA
Members of the tumor necrosis factor receptor superfamily				
CD40LG	CD70	FASLG	LTA	LTB
TNF	TNFRSF11β	TNFRSF10	TNFRSF11	
Others				
ADIPOQ	C5	CTF1	GDF15	MIF
SPP1	TGF-β2			

Table 2

Mean number of neutrophils per group (n=3) in cardiac sections of young and elderly rats submitted to acute pancreatitis or not.

Group	***Mean number of cells in cardiac sample***
young control	3
aged control	4
young pancreatitis	20
aged pancreatitis	11

FIGURE 1

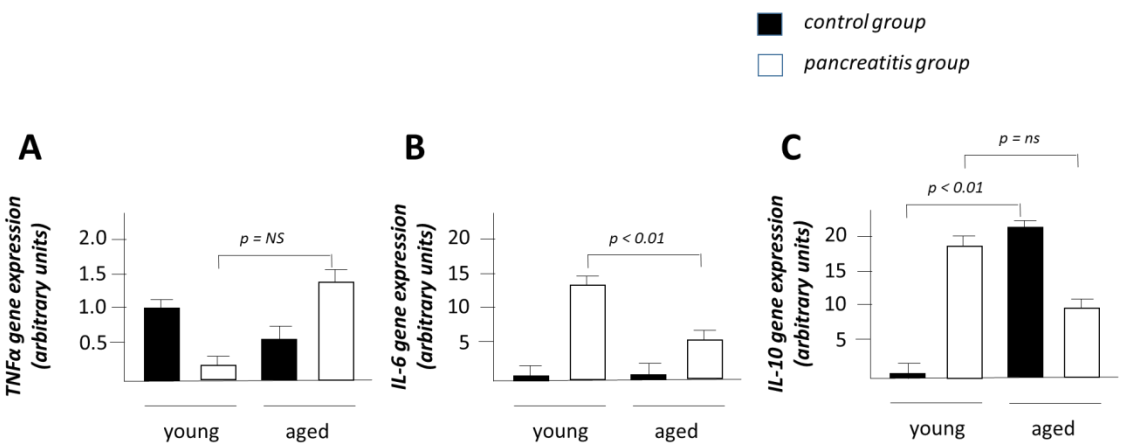
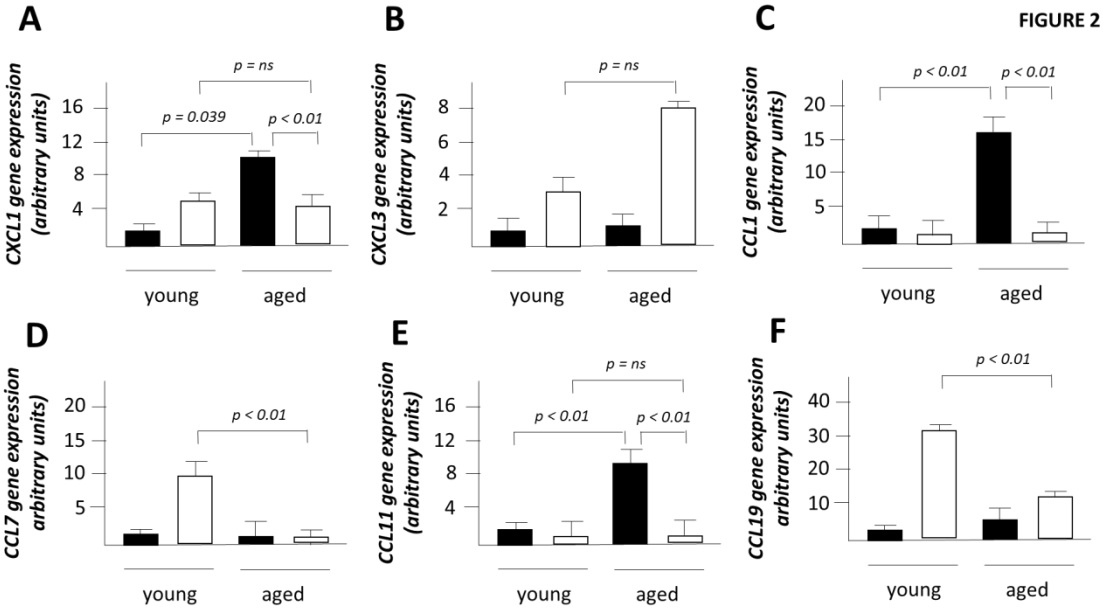
FIGURE 2