Flávia Llimona

**Co-ativador de transcrição gênica PGC-1 na
pancreatite aguda**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Processos Inflamatórios
e Alérgicos
Orientador: Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza

São Paulo
2011

Flávia Llimona

**Co-ativador de transcrição gênica PGC-1 na
pancreatite aguda**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de Concentração: Processos Inflamatórios
e Alérgicos
Orientador: Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza

São Paulo
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Llimona, Flávia

Co-ativador de transcrição gênica PGC-1 na pancreatite aguda / Flávia Llimona. --
São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Inflamatórios e
Alérgicos.

Orientador: Heraldo Possolo de Souza

Descritores: 1.Pancreatite 2.Sepse 3.PGC-1 4.Translocação bacteriana
5.Fagocitose

USP/FM/DBD-012/11

Dedicatória

À minha família, a base do meu aprendizado

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza, por me aceitar como aluna, dedicando parte de seu tempo à minha orientação, assim como pela paciência, atenção, ensinamento e respeito.

Ao Prof. Dr. Irineu Tadeu Velasco, por permitir o desenvolvimento de meu trabalho no LIM-51.

Ao Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano, pela atenção e ensinamento.

À Dra. Thais Martins Lima Salgado, por todo ensinamento, ajuda, companheirismo, colaboração e amizade, além da paciência e dedicação.

À Kelli Gouveia, Suely Kubo, Denise Frediani Barbeiro, Hermes Barbeiro, Fátima Abatepaulo, Marcia Koike e Geraldo Gonçalves Sobrinho, pelo suporte e colaboração em todos os momentos do laboratório, desde a realização de experimentos, ajuda motivacional, até o bom humor diário.

Aos alunos e ex-aluno do laboratório, pelo auxílio, apoio, amizade e muitos momentos de alegria.

À Mariana Cardillo Theobaldo e sua família, pela sua amizade, compreensão, paciência e grande colaboração.

Aos meus amigos, Ana Paula, Renata, Joice, Larissa, Tatiana, Maristela, Jakeline, William, Mauro, Carol, Paola, Sátyal, Priscila, Erica, Marisa, Gabriela, Nadine, Rossana, Letícia, Fernanda, Luciana, Viviane, Camila, que certamente participaram em muitas etapas desse trabalho.

Ao meu namorado Felipe, pelo apoio, compreensão e amor.

À minha mãe Aparecida Llimona e aos meus irmãos Fernando e Fabio, pela grande lição de vida que me passaram, por me ensinarem a ser

humilde e a respeitar outras vidas, por me fazer muito feliz e por estarem sempre ao meu lado.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro para a realização desse projeto.

*“Triste época! É mais fácil desintegrar
um átomo que um preconceito”*

Albert Einstein

*“Escuta e serás sábio. O começo
da sabedoria é o silêncio”*

Pitágoras

Sumário

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1. Introdução	1
1.1. Os coativadores de transcrição gênica PGC-1 α e β	2
1.1.1. Fatores de transcrição e correguladores da transcrição gênica.....	2
1.1.2. O coativador PGC-1	4
1.1.2.1.Estrutura	4
1.1.2.2.Expressão e Função	6
1.1.3. Controle da expressão de PGC-1	10
1.1.4. O efeito do coativador PGC-1 na resposta inflamatória	13
1.2. Pancreatite Aguda	16
1.2.1. Pancreatite Aguda.....	16
1.2.2. Translocação bacteriana durante a Pancreatite Aguda	18
1.2.3. Pancreatite aguda e MODS	19
 2. Hipótese	 24
 3. Objetivos	 26
3.1. Objetivos Gerais	27
3.2. Objetivos Específicos	27
 4. Métodos	 30
4.1. Local	31
4.2. Animais	31
4.3. Cultura primária de células do lavado peritoneal	31
4.4. Tratamento das células com LPS	32
4.5. Ensaio de fagocitose.....	32

4.6. Pancreatite Aguda.....	33
4.7. Tratamento com antibiótico.....	35
4.8. Peritonite e sepse por ligadura e perfuração cecal	35
4.9. Curvas de mortalidade	36
4.10. Lavado peritoneal.....	36
4.11. Coleta do pulmão, fígado, baço, linfonodo e sangue	37
4.12. Contagem de células sanguíneas	37
4.13. Dosagem de Amilase	38
4.14. Dosagem de Glicose.....	38
4.15. Silenciamento de RNA (PGC-1 α) em macrófagos peritoniais utilizando Oligonucleotídeo Antisense.....	39
4.16. Extração de RNA e PCR em tempo real	40
4.17. Análise estatística	42
5. Resultados	43
5.1. Análise da expressão de PGC-1 α em macrófagos peritoneais expostos a Zymosan e LPS	44
5.2. Capacidade fagocítica após transfecção com PGC-1 α ASO	45
5.3. Caracterização da Pancreatite Aguda.....	47
5.4. Análise de expressão de PGC-1 α e PGC-1 β	49
5.5. Expressão de PGC-1 α na inflamação e na infecção.....	57
5.6. Expressão de PGC-1 α após tratamento com antibiótico	58
6. Discussão.....	60
7. Conclusões	74
8. Referências	76

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
C2C12	linhagem de células de mioblasto de camundongo
cAMP	do inglês “Cyclic adenosine monophosphate” traduzido como adenosina monofosfato ciclico
CD	do inglês “Cluster of differentiation” traduzidos como conjuntos de diferenciação
cDNA	do inglês “Complementary DNA” traduzido como DNA complementar
CLP	do inglês “Cecal ligation puncture” traduzido como ligadura e perfuração cecal
COX	do inglês “Cytochrome c oxidase” traduzido como citocromo c oxidase
CRP	do inglês “C- reactive protein” traduzido como proteína reativa-C
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	do inglês “Desoxyribonucleic acid” traduzido como ácido desoxirribonucléico
ERR	do inglês “Estrogen related receptor” traduzido como receptor relacionado com estrogênio
EPM	Erro padrão da média
FOXO1	do inglês “Forkhead Box protein O1”
FXR	do inglês “Farnesoid X receptor” traduzido como receptor X farnesoide
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GR	do inglês “Glucocorticoid receptor” traduzido como receptor de glicocorticoide
GTP	Guanosina Trifosfato
HAT	do inglês “Histone acetyltransferase” traduzido como histona acetiltransferase
HCl	Ácido clorídrico
HNF	do inglês “Hepatocyte Nuclear factor” traduzido como fator hepatócito nuclear
IFN-γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
iNOS	do inglês “Inducible Nitric oxide synthase” traduzido como óxido nítrico sintase induzível
JAK	do inglês “Janus Kinase”
LPS	Lipopolissacáride
LXR	do inglês “Liver X receptor” traduzido como receptor X do fígado
M	Molar
MAPK	do inglês “Mitogen-activated Protein Kinase” traduzido como proteína quinase ativada por mitógeno
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MMPs	do inglês “Matrix Metalloproteinases” traduzido como metaloproteinases de matriz
MODS	do inglês “Multiple organ dysfunction score” traduzido como síndrome da disfunção de múltiplos órgãos
mRNA	RNA mensageiro
mtDNA	do inglês “mitochondrial DNA” traduzido como DNA mitocondrial
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
ng	nanograma
nM	Nanomolar

NO	do inglês “Nitric oxide” traduzido como óxido nítrico
NOX	NADPH oxidase
NRF	do inglês “Nuclear respiratory factor” traduzido como fator nuclear respiratório
PA	Pancreatite aguda
PAF	do inglês “Platelet-activating factor” traduzido como fator ativador de plaquetas
PBS	do inglês “Phosphate-buffered saline” traduzido como tampão salina fosfato
PEPCK	do inglês “Phosphoenolpyruvate carboxykinase” traduzido como fosfoenol piruvato carboxikinase
pg	Picogramas
PGC-1	do inglês “PPARγ coactivator 1” traduzido como coativador 1 do PPARγ
PPARs	do inglês “Peroxisome proliferator activated receptors” traduzido como receptores ativados por proliferadores de peroxisomos
PRC	do inglês “PGC-related coactivator” traduzido como coativador relacionado com PGC
RNA	do inglês “Ribonucleic acid” traduzido como ácido ribonucléico
ROS	do inglês “Reactive oxygen species” traduzido como espécies reativas de oxigênio
rRNA	do inglês “Ribosomal ribonucleic acid” traduzido como ácido ribonucléico ribossomal
RT-PCR	do inglês “Reverse transcriptase-polymerase reaction chain” traduzido como transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase
SAA	do inglês “Serum amyloid A” traduzido como amilóide sérica A

SIRS	do inglês “Sistemic inflammatory response syndrome” traduzido como síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SOCS	do inglês “Suppressor of cytokine signaling” traduzido como supressor de sinalização de citocinas
SREBP	do inglês “Sterol regulatory element binding protein” traduzido como proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol
STAT	do inglês “Signal transducer and activator of transcription” traduzido como sinal tradutor e ativador de transcrição
TNF	do inglês “Tumor necrosis factor” traduzido como fator de necrose tumoral
UCP	do inglês “uncoupling protein” traduzido como proteína desacopladora
UTI	Unidade de terapia intensiva
VLDL	do inglês “very low density lipoprotein” traduzido como proteínas de muita baixa deinsidade

Lista de Figuras

Figura 1 - Homologia entre os membros da família PGC-1.....	5
Figura 2 - Relação da expressão de mRNA de PGC-1 α com a expressão de GAPDH em cultura primária de macrófagos peritoneais	44
Figura 3 – Relação da expressão relativa de mRNA de PGC-1 α em relação à expressão de GAPDH em macrófagos peritoneais <i>in vitro</i>	45
Figura 4 – Taxa de fagocitose.....	46
Figura 5 – Dosagem de Amilase no soro	47
Figura 6 – Contagem total de leucócitos do sangue	48
Figura 7 – Dosagem de Glicose no soro	49
Figura 8 - Relação da expressão de mRNA de PGC-1 α com a expressão de GAPDH no pulmão.....	50
Figura 9 - Relação da expressão de mRNA de PGC-1 β com a expressão de GAPDH no pulmão.....	50
Figura 10 - Relação da expressão de mRNA de PGC-1 α com a expressão de GAPDH no fígado	51
Figura 11 - Relação da expressão de mRNA de PGC-1 β com a expressão de GAPDH no fígado	51
Figura 12 - Relação da expressão de mRNA de PGC-1 α com a	

expressão de GAPDH nos linfonodos mesentéricos	52
Figura 13 - Relação da expressão de mRNA de PGC-1 β com a expressão de GAPDH nos linfonodos mesentéricos	52
Figura 14 - Relação da expressão de mRNA de PGC-1 α com a expressão de GAPDH no Baço	53
Figura 15 - Relação da expressão de mRNA de PGC-1 β com a expressão de GAPDH no Baço	54
Figura 16 - Relação da expressão de mRNA de PGC-1 α com a expressão de GAPDH em leucócitos circulantes	55
Figura 17 - Relação da expressão de mRNA de PGC-1 β com a expressão de GAPDH em leucócitos circulantes	55
Figura 18 - Relação da expressão de mRNA de PGC-1 α com a expressão de GAPDH nas células do lavado peritoneal	56
Figura 19 - Relação da expressão de mRNA de PGC-1 β com a expressão de GAPDH nas células do lavado peritoneal	57
Figura 20 - Relação da expressão relativa de mRNA de PGC-1 α em relação à expressão de GAPDH nas células do lavado peritoneal.....	58
Figura 21 - Relação da expressão relativa de mRNA de PGC-1 α em relação à expressão de GAPDH em leucócitos circulantes.....	59

Resumo

Llimona, F. Coativador de transcrição gênica PGC-1 na pancreatite aguda. [Tese]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2011. 92p.

PGC-1 é uma família de coativadores de fatores de transcrição que controlam a expressão de diversos genes envolvidos na homeostase energética celular. As isoformas PGC-1 α e β estão presente em tecidos com alto metabolismo oxidativo e são capazes de aumentar biogênese mitocondrial, β -oxidação de ácidos graxos e gliconeogênese em resposta à exposição ao frio, jejum e exercício. Inicialmente mostramos que macrófagos *in vitro* aumentaram a expressão de PGC-1 α após 1h da exposição à zymosan. Com isso, hipotetizamos que PGC-1 poderia ter sua expressão aumentada em resposta a um insulto bacteriano. Para verificar nossa hipótese analisamos a expressão de PGC-1 em um modelo de pancreatite aguda (PA), caracterizada por uma forte resposta inflamatória estéril inicial, seguida, após poucos dias, por translocação bacteriana intestinal e infecção disseminada. PA foi induzida por infusão retrograda de taurocolato de sódio (2,5%). Também analisamos PGC-1 em um modelo de sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP), cujo conteúdo intestinal é depositado no peritônio, causando infecção grave local e disseminada. Animais tratados com Imipenem durante 48h após PA também foram analisados, bem como a interferência de PGC-1 α ASO no processo de fagocitose. A expressão de PGC-1 α e β foi medida por PCR quantitativo. PA foi confirmada pelo aumento da amilase sérica e a inflamação sistêmica ratificada por leucocitose. PGC1 α aumentou no baço e nos leucócitos circulantes 48h após PA e no lavado peritoneal 24h após PA e CLP. No entanto, PGC1 β diminuiu no baço 24h após PA. Tratamento com Imipenem diminuiu PGC-1 α . A diminuição de PGC-1 α após transfecção com ASO levou à redução do processo de fagocitose. Assim, concluímos que ocorre aumento de PGC-1 α na presença de bactérias e esse aumento está relacionado com fagocitose.

Descritores: Pancreatite, Sepse, PGC-1, Translocação Bacteriana, fagocitose

Summary

Llimona, F. Transcriptional coactivator PGC-1 in acute pancreatitis. [Thesis]; "Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo"; 2011. 92p

PGC1 is a family of transcriptional coactivators that controls the expression of several genes involved in cell energy homeostasis. PGC1 isoforms α and β are present in tissues with high oxidative metabolism and are able to enhance mitochondrial biogenesis, β -oxidation of fatty acids and gluconeogenesis in response to exposure to cold, fasting and exercise. Initial results showed macrophages *in vitro* present increased PGC-1 α expression after 1h exposure to zymosan. Thus, we hypothesized that PGC-1 could be up-regulated in response to bacterial insult. We tested our hypothesis following PGC-1 expression in an acute pancreatitis (AP) model, characterized initially by a strong sterile inflammatory response, followed, few days later, by bacterial intestinal translocation and disseminated infection. AP was induced by retrograde infusion of sodium taurocholate (2.5%). We also analysed PGC-1 in a model of sepsis by cecal ligation and puncture (CLP), whose intestinal content is deposited in the peritoneum, causing a severe local and disseminated infection. Animals submitted to PA and treated with Imipenem for 48 hours were also analyzed, as well as the interference of PGC-1 α ASO in phagocytosis process. PGC-1 α and β expression were measured by quantitative PCR. AP was confirmed by increased blood amylase and the systemic inflammation was noted by leukocytosis after 48h. PGC1 α was increased in spleen and circulating leukocytes 48h after AP and in peritoneal lavage 24h after AP and CLP. On the other hand, PGC1 β was decreased in spleen 24h after AP induction. Imipenem treatment decreased PGC-1 α . The decreased of PGC-1 α after ASO transfection led to a reduction of phagocytosis process. Thus, we conclude there is a PGC-1 α increase in bacterial presence and this increase is related to phagocytosis.

Descriptors: Pancreatitis, Sepsis, PGC-1, Bacterial Translocation, Phagocytosis

Introdução

1. Introdução

1.1. Os coativadores de transcrição gênica PGC-1 α e β

1.1.1. Fatores de transcrição e corre reguladores da transcrição gênica

Fatores de transcrição se ligam ao DNA em sequências específicas, levando à ativação ou repressão gênica. Porém, geralmente falta a eles atividade enzimática necessária para modificar a cromatina, desenrolar o DNA e recrutar a DNA polimerase II. Essas funções são exercidas pelos corre reguladores, complexos multiprotéicos formados no núcleo que podem ser recrutados por fatores de transcrição em resposta a sinais celulares (Spielman B.M.; Heinrich R., 2004).

Os corre reguladores podem ativar (coativadores) ou inibir (correpressores) a transcrição gênica. Coativadores são estimulados por uma grande variedade de vias de sinalização e contém a atividade enzimática necessária para a alteração na estrutura da cromatina de um estado quiescente para um estado que permite a transcrição ativa do gene (Spielman B.M., Heinrich R., 2004). Os mecanismos usados para modular a transcrição podem variar de acordo com coativadores transcripcionais específicos, seus padrões de ligação a fatores de transcrição, e o meio de ácidos nucleicos no qual eles operam (Spielman B.M., Heinrich R., 2004). Por outro lado, correpressores tem um efeito oposto na estrutura da cromatina, fazendo-a inacessível para a ligação de fatores de transcrição ou resistindo à sua ação.

Alguns autores consideram coativadores primários aqueles que se ligam diretamente a fatores de transcrição e contém relevante atividade enzimática, enquanto coativadores secundários são aqueles que servem como plataformas para o recrutamento de outras proteínas que contém essas atividades enzimáticas. Entretanto, esta distinção rapidamente se torna confusa, pois algumas proteínas podem funcionar como coativadores primários de muitos fatores de transcrição e podem também ser usadas como ferramentas enzimáticas acessadas por coativadores secundários em outros contextos (Spielman B.M.; Heinrich R., 2004).

O estudo de toda a maquinaria necessária para a transcrição tem importância direta para a fisiologia e fisiopatologia. Acreditava-se que a regulação da atividade gênica em nível transcricional ocorria através somente de mudanças na quantidade ou atividade de fatores de transcrição. No entanto, recentes estudos mostram que o controle fisiológico dos sistemas de regulação gênica não é unicamente proveniente dos fatores de transcrição (Spielman B.M.; Heinrich R., 2004), pois proteínas coativadoras podem participar na regulação de genes, não meramente como um mecanismo necessário da maquinaria transcricional, mas sendo um alvo primário de sinais fisiológicos e desenvolvimentais (Spielman B.M.; Heinrich R., 2004).

1.1.2. O Coativador PGC-1

1.1.2.1. Estrutura

A família dos coativadores PGC-1 (coativador 1 do PPAR γ) emergiu com importante papel na integração de vias de sinalização no controle do metabolismo celular e sistêmico.

O primeiro membro da família do PGC-1 foi identificado como uma proteína de interação com o PPAR γ (receptores ativados da proliferação de peroxissomos) no tecido adiposo marrom e foi denominado de PGC-1 α (Puigserver et al., 1998). Posteriormente foi identificado o PGC-1 β como o homólogo mais próximo do PGC-1 α , compartilhando extensas sequências idênticas (Kressler et al., 2002; Lin et al., 2002), agrupadas em diversos domínios distintos, incluindo um domínio de ativação N-terminal (40%), um domínio central regulatório (35%), e um domínio C-terminal de ligação ao RNA (48%). Outro membro da mesma família, o PRC (coativador relacionado com PGC) possui uma homologia mais limitada (Andersson U.; Scarpulla R.C., 2001), incluindo o domínio de ativação e o domínio de ligação ao RNA (fig. 1).

Figura 1: Homologia entre os membros da família PGC-1 (Lin et al. 2005)

Todos os membros da família dos PGC-1 têm um potente domínio de ativação transcricional, mas ao contrário de muitos coativadores, apresenta-se desprovido de atividade modificadora de histona. O efeito positivo do PGC-1 na transcrição parece ser mediado pela sua habilidade de recrutar outros coativadores que possuem atividade HAT (histona acetiltransferase) intrínseca (Puigserver et al., 1999).

O complexo ativador transcricional recrutado pelo PGC-1 é capaz de deslocar proteínas repressoras, como histona deacetilase e SHPs (pequenos heterodímeros associados), em seus promotores alvos, levando ao aumento da transcrição gênica (Borgius et al., 2002; Guan et al., 2005).

PGC-1 α também tem um domínio auto-inibitório na sua região central e essa inibição é diminuída pela fosforilação da p38 MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) (Puigserver et al., 2001; Knutti et al., 2001). Assim, está claro que PGC-1 α representa uma proteína coativadora secundária, servindo como uma grande plataforma de acesso a múltiplos grandes

complexos que podem modificar a cromatina. Entretanto, ainda não está claro se o complexo formado pelos membros da família dos PGC-1 com outros corretores é o mesmo em todos os tecidos e contextos biológicos, ou se há componentes que são adicionados ou subtraídos em diferentes contextos biológicos.

1.1.2.2. Expressão e Função

Embora apresentem padrões de expressão tecidual distintos e algumas funções específicas, os membros da família do PGC-1 possuem em comum o fato de controlarem o metabolismo de carboidratos e gorduras em múltiplos órgãos. Estão sob controle dos coativadores PGC-1 diversos processos metabólicos, incluindo gliconeogênese hepática e metabolismo lipoprotéico, determinação da fibra muscular esquelética, controle do ritmo circadiano, angiogênese, assim como polarização de macrófagos (Lin J.D., 2009).

PGC-1 β compartilha muitos dos seus genes alvos com PGC-1 α em análise de ganho de função (Lin et al., 2003), no entanto, ele é incapaz de compensar completamente a perda de PGC-1 α em uma transcrição normal desses genes. Os níveis de mRNA de PGC-1 β permanecem inalterados em diversos tecidos de camundongos deficientes em PGC-1 α . Essa perda de PGC-1 α leva a um significativo déficit funcional no metabolismo oxidativo em diversos tecidos e deixa os camundongos intolerantes ao exercício (Leone et al., 2005).

PGC-1 α foi primeiramente descrito em tecido adiposo marrom onde, durante exposição ao frio, causava aumento da termogênese induzindo desacoplamento mitocondrial (Puigserver et al., 1998). Posteriormente, descreveu-se sua expressão também em células adiposas, onde atua como coativador de PPAR γ , PPAR α , receptor do hormônio tireoidiano e outros fatores que executam um amplo programa de termogênese que inclui biogênese mitocondrial e expressão de UCP1 (proteínas desacopladoras), um desacoplador biológico do sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial. PGC-1 α é também altamente expresso em músculo esquelético, com um aumento da concentração ocorrendo em muitas fibras oxidativas, chamadas tipo-1 (Spielman B.M., Heinrich R., 2004).

Tanto PGC-1 α como PGC-1 β são altamente expressos no coração (Lin et al., 2002; Puigserver et al., 1998). Os níveis de mRNA de PGC-1 α são altos no coração neonatal, durante a ativação da biogênese mitocondrial e a mudança metabólica de glicólise para oxidação em músculo cardíaco (Lehman et al., 2000).

A expressão de PGC-1 α e β é induzida no fígado no nascimento. Estudos em cultura de hepatócitos e *in vivo* demonstraram que PGC-1 α é suficiente para ativar quase todos os aspectos de resposta hepática ao jejum, incluindo gliconeogênese, β -oxidação de ácido graxo, quetogênese e homeostase de ácido biliar. Isso é feito através da coativação de fatores de transcrição chave, como HNF4 α (fator hepatocitário nuclear 4-alfa), PPAR α , GR (receptor de glicocorticóide), FOXO1 (proteína forkhead box), FXR (receptor X farnesóide) e LXR (receptor X do fígado), e estimulando

diretamente a transcrição de seus promotores alvo (Oberkofler et al., 2003; Puigserver et al., 2003; Rhee et al., 2003; Shin et al., 2003; Yoon et al., 2001; Zhang et al., 2004). PGC-1 α está também elevado no fígado de pacientes com diabetes tipo-1 e tipo-2 (Lin et al., 2003; Yoon et al., 2001), onde é observado o aumento da gliconeogênese levando à piora do quadro clínico.

PGC-1 β também controla síntese hepática lipídica e produção de lipoproteína (Lin et al., 2005). Estudos recentes mostraram que PGC-1 β é um regulador chave dessas vias em resposta à dieta com gorduras saturadas (Lin et al., 2005). A expressão de PGC-1 β é altamente induzida no fígado pela dieta rica em gordura, provavelmente através da ação direta de ácidos graxos no hepatócito. PGC-1 β se liga e tem função de coativar a família de fatores de transcrição SREBP (proteína de ligação ao elemento de resposta ao esterol) e LXR, acoplando a síntese de triglicérides e colesterol, transporte de lipoproteína e secreção de VLDL (lipoproteína de baixa densidade). Esses resultados sugerem que a atividade de PGC-1 β na regulação do metabolismo hepático é fortemente influenciada pelo estado nutricional, talvez como um resultado de condições fisiológicas hormonais diferentes.

Uma notável propriedade do PGC-1 α é que sua alta expressão em culturas de mioblastos induz biogênese mitocondrial (Wu et al., 1999). Assim, para induzir mRNA de subunidades respiratórias, PGC-1 α aumenta os níveis de proteínas COX (citocromo C oxidase) IV e citocromo c como também o nível de estabilidade do mtDNA (DNA mitocondrial). PGC-1 α pode

também aumentar a expressão de genes da via de oxidação de ácidos graxos mitocondriais (Vega R.B., Huss J.M., Kelly D.P., 2000). NRF-1 (fator respiratório nuclear) e 2 são alvos do PGC-1 α (Wu et al., 1999) e são capazes de estimular a expressão do Tfam (fator de transcrição mitocondrial A), uma proteína da matriz mitocondrial essencial para a replicação e transcrição do DNA mitocondrial (Clayton D.A., 1991; Parisi M.A., Clayton D.A., 1991; Vibasius J.V., Scarpulla R.C., 1994). É interessante que tanto NRF-1 como PGC-1 estão entre um pequeno número de genes induzidos no fígado de ratos hipotiroídeos, sugerindo que o hormônio da tireóide tem um efeito na mitocôndria que pode ser mediado através desses fatores (Weitzel J.M., Radtke C., Setz H.J., 2001).

Recentes estudos em camundongos deficientes de PGC-1 α revelaram que embora esse coativador seja dispensável para a biogênese mitocondrial em si, ele é absolutamente requerido para a expressão normal de um grande número de genes mitocondriais (Leone et al., 2005; Lin et al., 2004).

Os estímulos simultâneos por PGC-1 α e β dos genes mitocondriais codificados pelos dois genomas levam ao aumento da capacidade enzimática da β -oxidação de ácidos graxos, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa (OXPHOS) (St-Pierre et al., 2003; Wu et al., 1999). Esses dois coativadores estimulam a biogênese mitocondrial com diferentes características metabólicas, refletindo o fato que eles coincidem na regulação da expressão, mas em distintos conjuntos de genes mitocondriais. A modulação relativa da atividade de PGC-1 α e β dentro da célula leva a um

fino ajuste da função mitocondrial em resposta a necessidades metabólicas específicas (Lin J. et al., 2005).

PGC-1 α estimula biogênese mitocondrial em miotubos C2C12, que resulta no aumento da massa e respiração mitocondrial (Wu et al., 1999). Como PGC-1 α , PGC-1 β também ativa biogênese mitocondrial, no entanto, PGC-1 β está relacionado com um maior aumento da fração respiratória (St-Pierre et al., 2003).

PGC-1 α e β estimulam a expressão de UCP2 e UCP3 (Puigserver et al., 2001; St-Pierre et al., 2003; Wu et al., 1999), que dissipam o gradiente de prótons e diminuem o potencial de membrana mitocondrial, um processo em que acredita-se reduzir altamente a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) pelas mitocôndrias (Miwa S., Brand M.D., 2003).

Em resumo, podemos afirmar que os coativadores PGC-1 exercem função crucial no controle da função mitocondrial e sua expressão está ligada a uma adequada homeostase do metabolismo energético celular. Não é de se estranhar, portanto, que distúrbios de sua função e/ou expressão possam estar relacionados à gênese de diversas doenças.

1.1.3. Controle da expressão de PGC-1

PGC-1 α está expresso em diversos tecidos, especialmente aqueles com alto metabolismo oxidativo, como coração, músculo esquelético, rim, tecido adiposo marrom, cérebro e fígado. Essas proteínas são altamente induzíveis, tipicamente quando há uma necessidade fisiológica para um

aumento no metabolismo oxidativo em um dado tecido (Spielman B.M., Heinrich R., 2004).

Alguns hormônios também possuem efeitos na expressão desses coativadores. O glucagon aumenta a expressão de PGC-1 α hepática durante o jejum, enquanto a insulina inibe sua expressão e atividade (Herzig et al., 2001; Yoon et al., 2001; Daitoku et al., 2003; Puigserver et al., 2003; Li et al., 2007). Os níveis hepáticos de PGC-1 α são inversamente correlacionados com a resistência à insulina em humanos (Croce et al., 2007). Em fígado de diabéticos a expressão de PGC-1 α apresenta-se aumentada (Yoon et al., 2001). Além disso, a indução do PGC-1 α no fígado pode ser devido a agentes que aumentam cAMP, especialmente glucagon e catecolaminas, e por glicocorticóides (Yoon et al., 2001). Esses são clássicos hormônios que induzem a gliconeogênese.

No músculo esquelético o coativador PGC-1 é modulado em diversas situações. Em músculo de humanos com resistência à insulina a expressão de PGC-1 α apresenta-se reduzida (Patti et al., 2003). A expressão de PGC-1 α é aumentada pela contração muscular e está envolvida em muitas adaptações metabólicas (Geng et al., 2010; Lira et al., 2010). O exercício agudo induz aumento da expressão de PGC-1 α e PRC (Baar et al., 2002; Pilegaard et al., 2003; Russell et al., 2005; Terada et al., 2002) e em treinamento de resistência ocorre aumento da expressão de PGC-1 α (Goto et al., 2000; Kuhl et al., 2006; Russell et al., 2003) e diminuição da expressão de PGC-1 β (Mortensen et al., 2006). A falta de atividade física ou

a denervação diminui a expressão de PGC-1 α (Timmons et al., 2006; Koves et al., 2005).

Ainda em músculo esquelético o NO induz biogênese mitocondrial e aumenta a expressão de PGC-1 α (Nisoli et al., 2003, 2004, 2005) através de sinalização dependente de AMPK (Lira et al., 2010).

PGC-1 também apresenta alterações de acordo com a dieta. A ingestão de lipídeos reduz a expressão de PGC-1 α (Richardson et al., 2005). Alimentação rica em gordura, durante 3 dias, em humanos saudáveis também resulta em diminuição da expressão de PGC-1 α e de genes mitocondriais em músculo esquelético (Sparks et al., 2005). Dieta rica em palmitato e estearato, ácidos graxos saturados de cadeia longa, diminuem a expressão de mRNA de PGC-1 α e PGC-1 β . Esses efeitos parecem ser mediados em nível transcricional pela ativação da via p38 MAPK (Crunkhorn et al., 2007).

No caso de animais que hibernam e necessitam de alterações no metabolismo energético, PGC-1 é modulado em diferentes tecidos. Os níveis de PGC-1 α apresentam-se aumentados durante o período de hibernação de morcegos em tecido adiposo marrom, rim, fígado, tecido adiposo branco, músculo esquelético e reduzidos no cérebro (Eddy e Storey, 2003).

Embora a expressão de PGC-1 β não seja regulada pela exposição ao frio, seu nível de mRNA é aumentado durante a diferenciação em cultura de adipócitos marrom e branco (Kamei et al., 2003; Lin et al., 2002).

Estudos recentes indicam que PGC-1 β é um alvo da sinalização de citocinas e é induzido em resposta ao interferon e a IL-4 (Sonoda et al.,

2007; Vats et al., 2006). Em macrófagos, PGC-1 β ativa a via alternativa que capacita os macrófagos a adquirirem propriedades anti-inflamatórias (Vats et al., 2006). Essa especificação funcional do fenótipo dos macrófagos é acompanhada pela estimulação do programa metabólico oxidativo. PGC-1 β também coopera com os receptores de estrógeno (ERR) α e regula genes que são críticos para a remoção do patógeno (Sonoda et al., 2007).

Fica claro, pelo exposto acima, que a expressão dos coativadores PGC-1 está relacionada a aumento da necessidade energética, como no caso do exercício, ou a adaptações fisiológicas do metabolismo, como no caso da resposta a dietas ricas em gordura. É interessante, também, o controle da expressão do PGC-1 em células do sistema imune, sugerindo que esses coativadores possam ser importantes durante o processo inflamatório.

1.1.4. O efeito do coativador PGC-1 na resposta inflamatória

Através do estudo de animais geneticamente modificados pudemos aprender muito sobre o papel dos coativadores PGC-1 no controle da resposta inflamatória. A perda específica de PGC-1 α no músculo causa a indução transcricional, nesse órgão, de muitos genes que podem ser parte de inflamação sistêmica ou local como IL-6, TNF α (fator de necrose tumoral), SOCS1 (supressora de sinalização de citocinas), SOCS3 e CD38 (conjunto de diferenciação) (Handschin C., Chin S., et al., 2007; Handschin C., Choi C.S., et al., 2007). Camundongos heterozigotos para PGC-1 α mostraram menor, mas significativa, elevação da expressão de muitos desses mesmos genes pró-inflamatórios.

Células primárias musculares com uma ablação genética de PGC-1 α exibem maior nível de mRNA de TNF α e de IL-6 que miotubos de animais selvagens e uma concentração elevada de proteína IL-6 foi observada em meio de cultura de células knockout para PGC-1 α comparada com células controles (Handschin C., Choi C.S., et al., 2007).

Em conjunto, esses dados sugerem uma função importante dos PGC-1 na resposta inflamatória fisiológica.

Macrófagos são as principais células fagocíticas do sistema imune, e tem um papel chave durante a defesa à infecção bacteriana. Na infecção, macrófagos ingerem patógenos bacterianos através de fagocitose. Fagossomos englobam patógenos e sofrem maturação para fagolisossomos onde os patógenos são destruídos.

A atividade anti-bacteriana dos macrófagos é ativada por INF- γ (interferon- γ) (Nathan et al., 1983), uma citocina pró-inflamatória que exerce seu efeito através da ativação da via JAK (quinase Janus)/STAT-1 (sinal tradutor e ativador de transcrição) (Darnell et al., 1994) e da indução transcricional de genes anti-bacterianos incluindo iNOS (óxido nítrico sintase) (MacMicking et al., 1995) e proteína LRG-47 ligante-GTP (immunity-related GTPase Irgm-1) (MacMicking et al., 2003; Gutierrez et al., 2004). Além disso, INF- γ altera a expressão de inúmeros genes, aumentando em 10% o transcriptoma de macrófagos (Ehrt et al., 2001). A expressão de PGC-1 β foi detectada em macrófagos e foi mais induzida por IFN- γ e IL-4, mas não por outras seis citocinas estudadas (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-13, TNF α e M-CSF) (Sonoda et al., 2007).

Durante a resposta inflamatória e, especificamente, no processo de fagocitose, ocorre aumento do consumo de oxigênio, tanto pelas mitocôndrias quanto pelo sistema NADPH oxidase (Nox2), a enzima responsável pela geração de superóxido com objetivo bactericida (Babior, 2004).

Micróbios são eliminados após o processo de fagocitose que induz ativação da enzima oxidase, associada à membrana, o que leva a uma explosão respiratória e resulta na geração de anion superóxido (Johnston R.B.Jr., 1981). Devido à fagocitose não ser necessariamente acompanhada pela explosão respiratória (Loike et al., 1979), a energia adicional requerida para essa função aparentemente deriva da glicólise. Embora o metabolismo glicolítico tenha a capacidade de aumentar drasticamente o suplemento de ATP, essa via é insuficiente para promover as necessidades das células ativadas, levando à diminuição da proliferação e à morte celular (Garedew A.; Moncada S., 2008).

Como descrito acima, os dados sobre o papel dos PGC-1 na inflamação ainda são escassos e o nosso conhecimento sobre sua função e o controle de sua expressão nas células do sistema imunológico ainda é incompleto.

1.2. Pancreatite Aguda

1.2.1. Pancreatite Aguda

Pancreatite aguda é um processo inflamatório devido a danos nas células acinares, caracterizado clinicamente por forte dor abdominal, náuseas, vômitos e um aumento das enzimas pancreáticas no sangue.

Migração de cálculo biliar dentro do ducto biliar e excesso do consumo de álcool são as principais causas da doença nos países ocidentais (Cartmell M.T., Kingsnorth A.N., 2000). Em uma menor porcentagem, a pancreatite pode ser induzida por hipercalcemia, hiperlipidemia, drogas, agentes infecciosos ou mesmo procedimentos cirúrgicos como colangiopancreatografia (Sakorafa G.H., Tsiotou A.G., 2000). Outros casos muito menos comuns, que também contribuem para a pancreatite aguda, incluem veneno de uma variedade de escorpiões ou pancreatite induzida por trauma.

Na maioria dos pacientes, a pancreatite é leve e responde a cuidados médicos básicos, requerendo simplesmente o restabelecimento de fluído intravenoso e tratamento com analgésicos (Dervenis et al., 1999).

Porém, a pancreatite aguda é uma condição que ainda está associada com morbidade e mortalidade substancial em sua forma severa, alcançando 15 a 40% (Rau et al., 1995; Neoptolemos et al., 1998; Raraty et al., 2004). Morte durante episódios de pancreatite pode ocorrer em dois picos. O primeiro pico ocorre precocemente, dentro da primeira semana após o início da doença, e está relacionada ao desenvolvimento da síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (MODS). Pacientes com um quadro grave que

sobrevivem além desse período podem desenvolver necrose peri-pancreática seguida por quadros infecciosos, pancreáticos ou sistêmicos, levando à sepse grave e, novamente, síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (MODS). (Beger et al., 1997).

Mortalidade durante os estágios precoces responde por aproximadamente 50% do total de mortalidade, o restante estando associado a complicações tardias, como a sepse (Johnson et al., 2001; Uhl et al., 1999; Mutinga et al., 2000; McKay et al., 1999).

Diversos fatores contribuem para MODS, entre eles citocinas (Rinderknecht H., 1994), ROS (Klar et al., 1990), PL-A2, elastases (Tsuji et al., 1994) e fluxo de cálcio (Sanfey et al., 1995). Em pancreatite aguda grave, o desenvolvimento de MODS é um resultado de anormalidades hemodinâmicas possivelmente secundárias a ativação de cininas e outros peptídeos vasoativos (Visconti et al., 1995).

Na pancreatite aguda são liberadas uma variedade de citocinas inflamatórias incluindo IL-1, IL-6, IL-8, PAF (fator ativador de plaquetas) e TNF (Pooran et al., 2003). Aparentemente, as citocinas pró-inflamatórias têm um papel importante na patogênese da pancreatite aguda e suas complicações sistêmicas (Kusske et al., 1996). A presença de altas concentrações de CRP (proteína C reativa) e SAA (amilóide A no soro) sugerem seu importante papel na patogênese da pancreatite aguda (Mayer et al., 2002). MMP-9 pode alterar a permeabilidade da membrana basal na barreira endotelial vascular (Johnatty et al., 1997; Wright K.M., Friedland J.L., 2004). A barreira endotelial prejudicada em diversos órgãos incluindo o

pâncreas, pulmão, rins e intestino está associada com um aumento da permeabilidade e consequente passagem de constituintes do sangue para diversos tecidos (Stephens et al., 1988; Murakami et al., 1995; Wang et al., 1995).

1.2.2. Translocação Bacteriana durante a Pancreatite Aguda

Pancreatite aguda apresenta, inicialmente, uma agressão não bacteriana, que induz o desenvolvimento de disfunção orgânica extra-pancreática incluindo dano agudo no pulmão, disfunção no fígado, falência renal, colapso circulatório e disfunção geral da barreira endotelial (Stenberg W., Tenner S., 1994; Zhao et al., 2005; Anderson R., Wang X.D., 2005), devido aos mecanismos explicitados nos parágrafos anteriores.

Mais tardiamente, a pancreatite aguda pode promover translocação bacteriana através de diversos fatores incluindo mobilidade intestinal alterada, imunossupressão, crescimento bacteriano e barreira mucosa prejudicada. Podem ocorrer, então, contaminação pancreática, complicações sépticas e consequente aumento de mortalidade tardia (Devernys et al., 2003).

Mediadores inflamatórios podem também afetar a microcirculação intestinal causando dano na microvilosidade. Isso permite translocação de endotoxinas e bactérias para dentro da circulação e aumenta o risco de infecção pancreática (Swank GM, Deitch E.A., 1996; Ammori B.J., 2003).

Estudos em ratos, onde foi induzida pancreatite aguda com taurocolato de sódio (2,5%), mostraram que esses animais apresentaram

translocação bacteriana para linfonodos precocemente, atingindo 60% após 6 horas da indução da pancreatite aguda, alcançando um pico máximo de 90% com 24 horas, mantendo-se em 70% com 48 horas, e decaindo para 40% em 96 horas (Souza et al., 1996). Os níveis de translocação bacteriana para o pâncreas apresentaram-se proporcionais aos dos linfonodos, indicando uma relação direta de contaminação entre esses dois tecidos (Souza et al., 1996).

1.2.3. Pancreatite Aguda e MODS

Os pulmões são os primeiros órgãos acometidos na disfunção de múltiplos órgãos induzida pela pancreatite aguda. Dano pulmonar é caracterizado pelo aumento da permeabilidade da barreira endotelial, ativação de macrófagos, liberação de mediadores, e ativação e seqüestro de neutrófilos dentro do compartimento intersticial alveolar (Ashbaugh et al., 1967).

Os pulmões se tornam edemaciados, com hemorragias e congestão vascular, levando ao colapso das vias aéreas menores, com diminuição da complacência e falência da função de troca gasosa. Em conjunto, esses mecanismos levam o paciente a uma progressiva falência respiratória que pode ser fatal (Ashbaugh et al., 1967).

Além dos pulmões, pacientes com pancreatite aguda também podem apresentar lesões na função renal e hepática (Bhatia et al., 2000). Mudanças na estrutura histológica do fígado e aumento nos níveis de transaminase foram notadas durante estágios precoces da pancreatite biliar (Isogai et al.,

1995). Animais submetidos a pancreatites agudas ou crônicas experimentais mostraram também focos dispersos de necrose, degeneração de hepatócitos e aumento das células de Kupffer.

Quase todas as enzimas pancreáticas e mediadores liberados do pâncreas inflamado para as vias sanguíneas podem passar através do fígado antes de sua diluição na circulação sistêmica. O fígado pode ter um ativo papel no desenvolvimento da injúria pulmonar secundária à pancreatite aguda (Folch-Puy, 2007).

Em um modelo experimental de pancreatite induzido por 5% de taurocolato de sódio em ratos o processo inflamatório no pulmão foi claramente prevenido quando uma derivação porto-cava foi realizada antes da indução da pancreatite. Esse fato aponta o papel chave do fígado nos processos inflamatórios no pulmão após a pancreatite aguda. Isso pode surgir do fato que a quantidade de citocinas liberadas do fígado representa por volta de 50% da quantidade total de citocinas no corpo (Saad B et al., 1995). É possível que esses mediadores produzidos pelo fígado possam funcionar como mensageiros, levando ao desenvolvimento de danos em órgãos distantes.

Muitas das manifestações sistêmicas reportadas na pancreatite aguda assemelham-se com aquelas vistas na sepse grave (Wilson et al., 1998). Esse fato levanta uma dúvida sobre a questão da resposta de citocinas que acompanha a pancreatite aguda ser um resultado primário da ativação de citocinas pela inflamação pancreática ou um produto secundário da produção de endotoxinas.

Na verdade, diversos trabalhos mostraram que a produção de TNF- α nos estágios precoces da pancreatite aguda também ocorre em animais livres de endotoxinas, indicando que a síndrome inflamatória no curso precoce da doença não é séptica (Grewal et al., 1994; Hughes et al., 1995; Eubanks et al., 1998).

Além disso, ocorrem na pancreatite aguda outros fenômenos que contribuem para os efeitos deletérios sistêmicos, como a ativação do sistema complemento (Whicher et al., 1982), a liberação de enzimas proteolíticas para a corrente sanguínea (Nakae et al., 1995) e a geração de radicais livres de oxigênio (Folch et al., 1998)

Observa-se, também, um desarranjo contínuo no metabolismo energético do fígado. Ocorre inicialmente um aumento da fosforilação oxidativa mitocondrial nas primeiras 12 a 24h, seguido por uma disfunção das mitocôndrias, o que acarreta a diminuição na produção de ATP (Migita et al., 2004).

O segundo estágio que ocorre durante a evolução da pancreatite aguda é claramente caracterizado por translocação bacteriana intestinal que, nesse caso, está associada com complicações sépticas (Ogawa M., 1998).

As definições correntes de resposta inflamatória sistêmica (SIRS), sepse, sepse grave e choque séptico (Physicians 1992) parecem simplistas ao serem aplicadas a uma síndrome tão complexa.

Na resposta do hospedeiro à infecção ocorrem inicialmente reconhecimento e resposta inicial aos produtos bacterianos, seguido de amplificação da resposta inicial e controle da resposta imune.

Produtos bacterianos, os chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), são reconhecidos pelo sistema imune inato (Janeway and Medzhitov 2002). A evolução nos dotou de receptores capazes de reconhecer esses padrões (os receptores de reconhecimento de padrões – PRRs), o que possibilitou a persistência de nossa espécie.

Os protótipos dos PRRs são os receptores toll-like (TLRs). Hoje são conhecidos 10 membros dessa família (Janeway and Medzhitov 2002), todos eles capazes de desencadear a cascata de sinalização que resulta na ativação da resposta imune inata, secreção de citocinas e ativação celular (Lien et al. 2000; Medzhitov and Janeway 2000; Lien and Ingalls 2002).

Seguido à interação inicial entre o micróbio e o hospedeiro, há uma ativação da resposta imune inata, a qual tem por objetivo coordenar a defesa, envolvendo tanto a imunidade humoral quanto a celular. Nesse cenário, as células mononucleares têm um papel fundamental, liberando não só as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6, mas também uma série de outras citocinas (IL-12 IL15, IL-18) e outras moléculas de baixo peso (Cohen 2002).

A profunda resposta pró-inflamatória que ocorre na sepse é balanceada por uma série de moléculas contra-regulatórias, na tentativa de resgatar o equilíbrio imunológico. Essa resposta moduladora envolve antagonistas como os receptores solúveis de TNF e IL-1, inativadores da cascata de complemento e citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10. Alterações metabólicas e enzimáticas também agem coordenadas nessa fase, com aumento da produção de cortisol, aumento de liberação de

catecolaminas, ativação endotelial e liberação de prostanóides (Cohen 2002). Outro fator importante no controle da resposta inflamatória nessa fase é a apoptose de linfócitos que ocorre com maior intensidade na sepse que em pacientes críticos não sépticos (Hotchkiss et al. 1999).

Esse processo e suas conseqüências funcionais são vistas como parte de um estado mais amplo de imunodepressão no paciente séptico, caracterizado por hiporresponsividade de células T e energia (Oberholzer et al. 2001). Baseado nesses achados, alguns pesquisadores vêem a sepse como um estado no qual a resposta imune está severamente comprometida e incapaz de erradicar o patógeno invasor (Hotchkiss and Karl 2003).

As complicações sépticas que ocorrem na pancreatite aguda agravam o quadro da doença, levando ao aumento da mortalidade nos pacientes acometidos. A comprovação precoce de sepse em pacientes com pancreatite aguda é importante para o seu manuseio, utilização racional dos recursos e predição de evolução e prognóstico.

Hipótese

2. Hipótese

De acordo com os dados da literatura, o PGC-1 é crucial em situações onde ocorre aumento da demanda energética. Durante a resposta imune a bactérias, principalmente durante a fagocitose, é demonstrado um aumento do consumo de oxigênio, não só pela NADPH oxidase que gera superóxido, mas também pelas mitocôndrias.

Resultados iniciais de nosso laboratório mostram que macrófagos peritoneais de ratos em cultura, quando expostos ao zymosan, um complexo de proteínas derivadas da parede de células de leveduras que induz a fagocitose, apresentaram um aumento da expressão de PGC-1 α após 1 hora. Esse aumento não foi observado quando os macrófagos peritoneais foram expostos ao LPS, lipopolissacarídeos de paredes de bactérias que promovem estímulos inflamatórios porém não incitam a fagocitose.

Assim, formulamos a hipótese de que o PGC-1 poderia aumentar em resposta a um insulto bacteriano, mas não em resposta a um processo inflamatório não infeccioso.

Para tentar provar a veracidade de nossa hipótese, comparamos o padrão de expressão de PGC1 (α e β) entre um modelo experimental de PA (pancreatite aguda) e um modelo de peritonite e sepse por CLP (ligadura e perfuração cecal).

A PA é uma doença inflamatória aguda onde não ocorre infecção nos momentos iniciais do quadro e ocorre translocação bacteriana intestinal em estágios avançados. Já na CLP, o conteúdo intestinal é depositado no peritônio, causando uma infecção grave local e disseminada.

Objetivos

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral:

Determinar se ocorre modulação da expressão do coativador PGC-1, em suas isoformas α e β , durante a pancreatite aguda nos estágios iniciais (processo inflamatório asséptico) e nos estágios avançados (presença de translocação bacteriana), e durante a sepse induzida por CLP (presença de infecção grave).

3.2. Objetivos específicos:

3.2.1. Avaliar a expressão de PGC-1 α em macrófagos peritoneais expostos ao Zymosan e ao LPS em cultura primária.

Estratégia: Células do lavado peritoneal de ratos foram coletadas, cultivadas em meio de cultura para exposição às substâncias (Zymosan e LPS) e posterior análise da expressão gênica de PGC-1 α .

3.2.2. Verificar o envolvimento de PGC-1 α no processo de fagocitose utilizando oligonucleotídeo antisense (PGC-1 α ASO).

Estratégia: A expressão de PGC-1 α foi reduzida através da transfecção em macrófagos peritoneais de ratos em cultura com PGC-1 α ASO e, em seguida, realizou-se ensaio de fagocitose.

3.2.3. Estabelecer o modelo de pancreatite aguda em ratos.

Estratégia: Ratos foram submetidos à cateterização do ducto de Wirsung e infusão de ácido taurocólico, causando pancreatite aguda.

3.2.4. Estabelecer o modelo de peritonite e sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP) em ratos.

Estratégia: Ratos foram submetidos à ligadura e perfuração cecal, de maneira que desenvolveram peritonite e sepse.

3.2.5. Estabelecer curvas de mortalidade de maneira a comparar a gravidade da pancreatite com a sepse por CLP.

Estratégia: Os modelos de pancreatite e sepse por CLP foram estabelecidos de maneira que apresentaram mortalidade semelhante, aproximadamente 30% após 24 horas.

3.2.6. Avaliar a modulação da expressão de PGC-1 (α e β) após pancreatite aguda em diferentes momentos e após sepse por CLP.

Estratégia: Após os modelos estabelecidos, foi avaliada a expressão de PGC-1 (α e β) nos seguintes tecidos: fígado, pulmão, baço e linfonodo, além de leucócitos circulantes e lavado peritoneal. A avaliação foi realizada 2, 24 e 48 horas após a indução de pancreatite aguda. Após 24 horas da indução de sepse por CLP foi medida a expressão de PGC-1 α nos macrófagos peritoneais e nos leucócitos circulantes.

3.2.7. Avaliar se a modulação da expressão de PGC-1 α se mantém nos animais submetidos à pancreatite aguda após administração de antibiótico.

Estratégia: A expressão de PGC-1 α foi medida após 48 horas da indução de pancreatite aguda nos animais, tratados com antibiótico imipenem.

Métodos

4. Métodos

4.1. Local

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

4.2. Animais

Ratos Wistas, machos, de 280g a 350g 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 entre $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Os animais foram anestesiados com injeção intra - peritoneal (i.p.) de Ketamina (Parke-Davis, São Paulo, Brasil) - 10mg/kg de peso do animal e Rompum (Bayer healthCare, São Paulo, Brasil) - 8mg/kg de peso do animal antes de todos os procedimentos cirúrgicos.

4.3. Cultura Primária de Células do Lavado Peritoneal

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Foi feita laparotomia e perfundiu-se o peritônio com 40ml de meio de cultura RPMI (Cultilab, Campinas, SP). O lavado foi retirado com uma pipeta Pasteur e centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, as células foram ressuspensas em tampão de lise (10mM de Tris; 5mM de

MgCl₂; 10mM de NaCl) e novamente centrifugadas a 3000 rpm por 2 minutos.

O sobrenadante foi novamente descartado e as células foram ressuspensas em 1ml de PBS (tampão fosfato-salino) (NaCl – 8 g/l; KCl – 0.20 g/l; Na₂HPO₄ – 1.44 g/l; KH₂PO₄ – 0.24 g/l; pH – 7.4) . As células foram plaqueadas na concentração de 4x10⁶/ml com meio RPMI contendo 10% de SFB (soro fetal bovino) (Invitrogen by Life technologies, USA).

As células foram mantidas em cultura (37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico) por 1 hora e 30 minutos para adesão dos macrófagos. Em seguida, lavou-se as placas com PBS para remoção das células não aderidas.

4.4. Tratamento das células com LPS

Após a adesão, os macrófagos peritoneais foram tratados com 1µg/ml LPS por 1h. Após esse período, retirou-se o sobrenadante, as placas foram lavadas com PBS e adicionou-se 1ml de TRIzol[®] (Invitrogen Life Science, USA) para a remoção das células aderidas.

As amostras foram armazenadas em freezer -80°C para posterior análise da expressão de PGC-1α por PCR em tempo real.

4.5. Ensaio de Fagocitose

O ensaio de fagocitose foi realizado com a cultura primária de células do lavado peritoneal, como descrito no item 4.3.

As células foram cultivadas em placas contendo lamínulas previamente limpas na concentração de 4×10^6 células por poço. A suspensão de zymosan teve sua concentração ajustada para 4×10^7 partículas/mL em meio RPMI (Cultilab, Campinas, SP) contendo 10% de SFB (Invitrogen by Life technologies, USA), sem antibióticos. Um mL dessa suspensão foi adicionado a cada poço contendo as células previamente aderidas e lavadas com PBS. As placas foram mantidas a 37°C por 1 hora. Após a incubação as lamínulas foram fixadas e coradas com May-Grunwald-Giemsa, modificado por Rosenfeld para determinação do índice de fagocitose (Herscowitz et al., 1981). A leitura foi feita em microscópio óptico, com aumento de 400 vezes. A taxa de fagocitose foi obtida em percentual, através da contagem de macrófagos que fagocitaram o zymosan, em um total de 200 células.

Para a determinação da expressão de PGC-1 nestas células, foi realizado o mesmo tratamento. No entanto, após a incubação o sobrenadante foi retirado, as placas foram lavadas com PBS e adicionou-se 1ml de TRIzol® (Invitrogen Life Science, USA) para a remoção das células aderidas.

As amostras foram armazenadas em freezer -80°C para posterior análise da expressão de PGC-1 α por PCR em tempo real.

4.6. Pancreatite Aguda

Após anestesia, foi feita laparotomia e a alça do duodeno foi exposta para a visualização do ducto pancreático. Com agulha, perfurou-se o

pâncreas 5mm abaixo da papila do ducto pancreático e uma cânula de polietileno PE-50 (Intracath, Becton-Dickson, USA) foi introduzida por essa perfuração até entrar no ducto pancreático. Esse ducto foi preso por um clamp na porção superior do pâncreas e injetou-se, através da cânula, 0,1ml/100g de peso do animal de ácido taurocólico (Sigma Chemical CompanyTM, St. Louis, USA) a 2,5%. Após a injeção do ácido, o clamp foi retirado e o animal foi suturado.

Nos períodos de 2, 24 e 48h após a indução de pancreatite aguda, os animais foram sacrificados com doses letais de Ketamina e Rompum nas proporções acima descritas e coletou-se amostras de fígado, pulmão, lavado peritoneal, baço, linfonodo e sangue. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C para posterior análise.

Outro grupo de animais foi submetido à cirurgia sem que houvesse a cateterização do ducto pancreático e injeção do ácido taurocólico, sendo suturados após a laparotomia e sacrificados nos mesmos períodos acima citados. Esses animais, denominados sham, foram utilizados como controles do estudo.

O número de animais utilizados em cada grupo do experimento foi no máximo $n = 10$, diferindo em alguns experimentos. Os animais foram randomizados em grupos de acordo com a tabela a seguir (tabela 1):

Tabela 1. Grupos de animais utilizados no experimento, indicando as abreviações utilizadas e seus respectivos significados.

S2h	Animal sham sacrificado após 2h.
P2h	Animal submetido à PA e sacrificado após 2h.
S24h	Animal sham sacrificado após 24h.
P24h	Animal submetido à PA e sacrificado após 24h.
S48h	Animal sham sacrificado após 48h.
P48h	Animal submetido à PA e sacrificado após 48h.

4.7. Tratamento com Antibiótico

Os animais foram submetidos à pancreatite aguda conforme procedimento descrito no item 4.6. Trinta minutos após a cirurgia, iniciou-se o tratamento dos animais com o antibiótico Imipinem/Cilastatina (ABL – Antibióticos do Brasil) 100mg/kg, administrados a cada 12 horas, por via subcutânea.

Os animais foram sacrificados 48 horas após a indução da pancreatite aguda e coletou-se 10ml de sangue. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C para posterior análise.

4.8. Peritonite e sepse por ligadura e perfuração cecal

Após anestesia, foi feita laparotomia e o ceco foi amarrado a 2,0 cm do término, com fio de algodão. Foram realizados 3 furos na porção amarrada do ceco, com agulha 30X10 mm 19G.

Após 24h os animais foram sacrificados com doses letais de Ketamina e Rompum nas proporções acima descritas e coletou-se amostras de lavado peritoneal e sangue. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C para posterior análise.

4.9. Curvas de mortalidade

Com o objetivo de se criar lesões sistêmicas comparáveis por pancreatite ou sepse, as lesões iniciais foram padronizadas de maneira a provocarem mortalidade similar.

Após anestesia, foram realizados os procedimentos cirúrgicos de pancreatite aguda ou sepse, conforme descrito acima. Os animais foram mantidos em condições normais, e observados a cada 6 horas. Para que não houvesse grande discrepância entre a mortalidade dos grupos pancreatite e sepse, as lesões foram modificadas através da quantidade de ácido taurocólico injetado (no grupo pancreatite) e no número de furos feitos no ceco (no grupo sepse). O objetivo final foi que ambos os grupos tivessem mortalidade entre 25 e 30% após 24h.

4.10. Lavado Peritoneal

Após o sacrifício, coletou-se o lavado peritoneal dos animais conforme procedimento descrito no item 4.3, porém, utilizou-se PBS no lugar de RPMI.

As células foram ressuspensas em TRIzol[®] (Invitrogen Life Science, USA) e estocadas a -80°C até o momento da análise.

4.11. Coleta do pulmão, fígado, baço, linfonodo e sangue

Após a retirada do lavado peritoneal a cavidade abdominal do animal foi dissecada. Com uma seringa contendo heparina, retirou-se 10ml de sangue diretamente do coração do animal. Em seguida, fez-se um pequeno corte no ventrículo esquerdo desse animal e através de uma seringa com agulha, seu coração foi perfundido com aproximadamente 4ml de solução fisiológica (0,9% NaCl).

Foram retirados pulmão, fígado, baço e linfonodos. Os tecidos foram macerados, ressuspensos em TRIzol[®] (Invitrogen Life Science, USA) e armazenados a -80°C.

4.12. Contagem de células sanguíneas

O sangue dos animais foi coletado com substância anti-coagulante (heparina) e o número de leucócitos foi determinado utilizando contador automatizado, modelo JXJ402 (Odin Biotechnology), seguindo o procedimento indicado pelo fabricante.

Foram utilizados 20µl de sangue diluídos em 5ml de solução salina isotônica NaCl-0,9% (diluição 1:250). 500µl dessa solução foram transferidos para outro recipiente contendo 5ml de solução salina isotônica NaCl-0,9% (diluição 1:2750) para contagem de células vermelhas. Na solução com diluição 1:250 foram acrescentadas 3 (três) gotas de solução de lise (cianeto de potássio) e aguardou-se 3 minutos antes da contagem de células brancas.

4.13. Dosagem de Amilase

Foi utilizado o kit para determinação de amilase da Labtest (Minas Gerais, Brasil) conforme protocolo do fabricante.

0,5ml do substrato nº1 (amido 0,4g/l, tampão fosfato pH 7 e estabilizador) foi incubado em banho maria a 37°C durante 2 minutos. Em seguida, foram acrescentados 0,01ml de cada amostra de soro dos animais submetidos à pancreatite aguda, no seu respectivo tubo de ensaio, com exceção do tubo que representava o controle. Essa solução foi homogeneizada e incubada em banho-maria a 37°C por exatamente 7 minutos e 30 segundos (cronometrados).

Acrescentou-se 0,5ml do reagente de cor (iodato de potássio 16,7 mmol/l, iodeto de potássio 271mmol/l e ácido clorídrico 112mmol/l) e 4ml de água destilada. As soluções foram homogeneizadas e após 5 minutos determinou-se as absorbâncias das amostras e do controle a 660nm, acertando o zero com água destilada.

Os cálculos realizados foram:

amilase (unidades/dL) = $(Ac - At / Ac) \times 800$, onde:

Ac = absorbância do controle

At = Absorbância do teste

4.14. Dosagem de Glicose

Foi utilizado o kit para determinação de glicose da Labtest (Minas Gerais, Brasil) conforme protocolo do fabricante.

Colocou-se 0,01ml de padrão ou 0,01ml de amostra (soro dos animais) em tubos diferentes e acrescentou-se 1,0ml do reagente de trabalho. Em outro tubo colocou-se apenas 1,0ml de reagente de trabalho representando o branco. Incubou-se em banho-maria a 37°C durante 5 minutos.

Determinou-se as absorbâncias das amostras a 340nm, acertando o zero com o branco.

Os cálculos realizados foram:

$$\text{Glicose (mg/dL)} = (\text{Absorbância do teste}/\text{Absorbância do padrão}) \times 100$$

4.15. Silenciamento de RNA (PGC-1 α) em macrófagos peritoneais utilizando Oligonucleotídeo Antisense

Para o silenciamento do gene PGC-1 α utilizamos cultura primária de células do lavado peritoneal, conforme item 4.3.

O bloqueio da expressão de PGC-1 α foi realizado de acordo com as instruções do fabricante do PGC-1 α ASO (Invitrogen Life Science, USA). As células foram incubadas com 1ml de meio livre de soro (Opti-MEM, Invitrogen, Carlsbad, CA) contendo PGC-1 α ASO (concentração final 1 μ M) previamente misturado com 2,5 μ l de lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) ou somente lipofectamina (usado como controle). Após 4 horas, foi adicionado 1ml de meio RPMI contendo 20% de soro fetal bovino, 22.2mM de glicose e penicilina (200 U/ml) e estreptomicina (0,2mg/ml), com a finalidade de compor as concentrações usuais destes componentes para a permanência em cultura das células. A troca do meio de cultura por meio

RPMI com concentrações usuais de glicose, soro fetal bovino e antibiótico foi realizada com 24h de transfecção. Após 48h de cultura, o meio de cultura foi retirado, as placas foram lavadas com PBS, acrescentou-se 1ml de TRIzol® (Invitrogen Life Science, USA) para posterior extração de RNA. As células foram coletadas e armazenadas a -80°C.

A sequência do oligonucleotídeo antisense utilizado segue abaixo:

PGC-1α ASO: 5' – GCC ATC CAG CTC CTG A – 3'.

4.16. Extração de RNA e PCR em tempo real

Realizou-se a extração de RNA das células e tecidos utilizando 1ml do reagente TRIzol®. Neste foi adicionado 200 µl de clorofórmio, seguindo-se vigorosa homogeneização por 15 segundos e incubação à temperatura ambiente por 3 minutos. A separação de fases foi feita por centrifugação a 12.000g por 15 minutos a 4°C. O RNA presente na fase aquosa (superior) foi transferido para outro tubo e precipitado pela adição de 0,5 mL de isopropanol por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com 1 mL de etanol a 75 % (com o uso de vórtex), centrifugado a 7000g por 5 minutos, seco a temperatura ambiente e ressuspenso em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato).

Para a quantificação dos RNAs as amostras foram diluídas em água DEPC (diluição 1:100) e a absorbância da amostra foi determinada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 nm (correspondente

ao pico de absorção de RNA) e 280 nm (correspondente ao pico de absorção de proteínas).

Os níveis de transcritos de PGC-1 foram determinados por PCR em tempo real utilizando termociclador Applied Biosystems StepOne™, com primers específicos para cada gene. Os resultados expressos pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et al., 2001; Pfaffl et al., 2001), usando o gene housekeeping gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Esse gene foi escolhido após análise pelo software genorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm>) de 5 genes housekeeping (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; tirosina 3-monooxigenase/triptofano 5-monooxigenase; β -2 microglobulina; hipozantina guanina fosforibosil tranferase 1 e ubiquitina C).

A reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando o kit SuperScript™ III Platinum® SUBR® Green One-Step (Invitrogen Life Science, USA). Cada reação foi realizada com 15 μ l, contendo 1,45 μ l de água deionizada estéril; 7,5 μ l de 2x SYBR Green Reaction Mix (Invitrogen); 0,3 μ l de cada primer a 10nM; 0,3 μ l de Super Script III RT/Platinum Taq Mix a 10pmol/ μ l, 0,15 μ l de ROX Reference Dye e 5 μ l de amostra (100ng de mRNA diluído em água DEPC). Todas as reações foram acompanhadas de controle negativo (todos os componentes da reação, exceto a amostra).

Na tabela abaixo (tab.2) encontram-se as sequências dos primers e condições de cada reação.

Tab.2. Seqüência dos primers usados na reação de real-time PCR.

Gene	Primer	Ciclos	Annealing
PGC-1 α	F: 5'-CTA ACA GAC ACC GCA CAC ATC GC-3' R: 5'-TCT CTC TGC TTG GCC CTT TCA G-3'	40	56,7°C
PGC-1 β	F: 5'-CAG TTC TGG CTC CTC ATC CTG-3' R: 5'-GTA TAC CAC ACG ACC TTC ACC G-3'	40	56,8°C
GAPDH	F: 5'-ATG ATT CTA CCC ACG GCA AG-3' R: 5'-CTG GAA GATGGT GAT GGG TT-3'	35	60,0°C

4.17. Análise estatística

Os dados numéricos são reportados como médias $\pm$ EPM. Comparações entre os grupos foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) e grupos individuais foram comparados pelo teste de Tukey. As diferenças significativas foram consideradas nos grupos que obtiveram $p \leq 0,05$.

Resultados

5. Resultados

5.1. Análise da expressão de PGC-1 α em macrófagos peritoneais expostos a Zymosan e LPS

Nos macrófagos peritoneais expostos a zymosan por 1 hora houve aumento de $3,85 \pm 0,15$ vezes na expressão de PGC-1 α em relação ao grupo controle e de $2,00 \pm 0,55$ vezes em relação ao grupo exposto ao LPS, respectivamente. O tratamento com LPS levou ao aumento de $1,93 \pm 0,55$ na expressão de PGC-1 α em relação ao grupo controle (Fig.2).

Fig.2. Relação da expressão de mRNA de PGC-1 α com a expressão de GAPDH em cultura primária de macrófagos peritoneais. Controle – macrófagos mantidos em meio RPMI com 10% de SFB por 1 hora; Zymosan – macrófagos expostos a Zymosan (4×10^7 partículas/ml) por 1h; LPS – macrófagos expostos a LPS (1 μ g/ml) por 1h. * $p \leq 0,05$ vs controle; # $p \leq 0,05$ vs LPS. $n = 3$.

5.2. Capacidade fagocitária após transfecção com PGC-1 α ASO

Para analisar se o coativador PGC-1 α está envolvido com o processo de fagocitose, transfectamos macrófagos peritoneais de ratos em cultura com oligonucleotídeos antisense (ASO) para PGC-1 α e depois de detectada diminuição da expressão desse gene, analisamos a taxa de fagocitose.

Após 48h de transfecção, observamos diminuição da expressão de PGC-1 α no tratamento com ASO ($1,00 \pm 0,74$) em relação ao grupo controle ($6,53 \pm 0,98$) e ao grupo tratado com lipofectamina ($5,12 \pm 0,66$) (fig. 3).

Fig.3. Relação da expressão relativa de mRNA de PGC-1 α em relação à expressão de GAPDH nos macrófagos peritoneais *in vitro* transfectados com ASO. Controle – macrófagos mantidos em meio opti-men; Lipofectamina – macrófagos tratados com lipofectamina sem adição de ASO; ASO – macrófagos tratados com lipofectamina e ASO. * $p \leq 0,05$ vs Controle; # $p \leq 0,05$ vs Lipofectamina. $n = 7$.

Como mostrado na figura 4, observamos que a diminuição de PGC-1 α pelo ASO causou uma redução no processo de fagocitose quando comparado com o grupo tratado com lipofectamina (controle).

Fig.4. Taxa de fagocitose. Lipofectamina – macrófagos tratados com lipofectamina sem adição de ASO; ASO – macrófagos tratados com lipofectamina e ASO. * $p \leq 0,05$ vs Lipofectamina. $n = 9$.

Esses dados mostram que a presença do coativador PGC-1 α é importante para a função fagocítica desempenhada por macrófagos.

5.3. Caracterização da Pancreatite Aguda

A infusão de ácido taurocólico causou uma pancreatite aguda grave. Minutos após o procedimento cirúrgico, o pâncreas tornou-se edemaciado e com focos de hemorragia subcapsular.

A dosagem de amilase no soro dos animais também confirma que o procedimento cirúrgico utilizado provocou pancreatite aguda, uma vez que observamos aumento na concentração de amilase em estágios precoces da pancreatite aguda (Fig. 5). Também podemos observar uma aumento da quantidade de amilase no soro dos animais sham após 48 horas e, nesse mesmo período, observamos diminuição da amilase circulante nos animais submetidos à pancreatite aguda.

Fig.5. Dosagem de Amilase no soro. Unidade de amilase por decilitro de soro. Sham – animal laparatomizado; Pancreatite – animais submetidos à PA. * $p \leq 0,05$ vs sham 2h; # $p \leq 0,05$ vs sham 48h. $n = 6$.

Os animais submetidos à pancreatite aguda apresentaram alta mortalidade, em torno de 30% nas primeiras 24 horas e 50% em 48 horas. Os animais que sobreviveram ao procedimento exibiram um comportamento hipoativo e perda de peso de, aproximadamente, 18 gramas após 48 horas da indução de pancreatite aguda (dados não mostrados).

A natureza sistêmica do processo inflamatório induzido através da pancreatite aguda foi confirmada pelo aumento do número de células brancas no sangue.

Como mostra a figura 6, durante os primeiros estágios de indução da pancreatite aguda (2h e 24h) não ocorreram alterações no número de células brancas no sangue dos animais, em relação aos animais sham. No entanto, há um significativo aumento do número de leucócitos circulantes nos animais submetidos à pancreatite aguda após 48 horas.

Fig.6. Contagem total de leucócitos do sangue. Relação de mil células brancas por mm^3 de sangue. Sham – animal laparatomizado; Pancreatite – animais submetidos à PA. * $p \leq 0,05$ vs sham 48h; \$ $p \leq 0,05$ vs sham 24h e Pancreatite 24h; # $p \leq 0,05$ vs sham 2h e Pancreatite 2h. $n = 4$.

Em relação à concentração de glicose no soro dos animais, observamos altos níveis logo após o procedimento cirúrgico, entre 390 e 460 mg/dl. Nos períodos de 24h e 48h, a glicemia dos animais era menor que a observada inicialmente, porém não houve diferença entre os grupos sham e PA (fig. 7).

Fig.7. Dosagem de Glicose no soro. mg de glicose por decilitro de soro. Sham – animal laparatomizado; Pancreatite – animais submetidos à PA. * $p \leq 0,05$ vs sham 24h e 48h; # $p \leq 0,05$ vs pancreatite 24h e 48h. $n = 7$.

5.4. Análise de expressão de PGC-1 α e PGC-1 β .

A expressão de mRNA de PGC-1 α e β foi avaliada em diversos tecidos de animais submetidos à pancreatite aguda e sham, utilizando PCR em tempo real.

Não observamos alteração na expressão de PGC-1 α e β no pulmão dos animais submetidos à PA em nenhum período avaliado (fig.8 e fig.9).

Fig.8. Relação da expressão de mRNA de PGC-1 α com a expressão de GAPDH no pulmão. Sham – animal laparatomizado; Pancreatite – animais submetidos à PA. n = 7.

Fig.9. Relação da expressão de mRNA de PGC-1 β com a expressão de GAPDH no pulmão. Sham – animal laparatomizado; Pancreatite – animais submetidos à PA. n = 7.

No fígado, também observamos que a pancreatite aguda não induz alterações na expressão dos coativadores PGC-1 α e PGC-1 β ao longo do

curso da doença em comparação aos respectivos grupos controles (Fig.10 e Fig.11).

Fig.10. Relação da expressão de mRNA de PGC-1 α com a expressão de GAPDH no fígado. Sham – animal laparatomizado; Pancreatite – animais submetidos à PA. n = 7.

Fig.11. Relação da expressão de mRNA de PGC-1 β com a expressão de GAPDH no fígado. Sham – animal laparatomizado; Pancreatite – animais submetidos à PA. n = 7.

A expressão de PGC-1 α e PGC-1 β nos linfonodos mesentéricos também não apresentou alterações nos períodos estudados (fig.12 e fig.13).

Fig.12. Relação da expressão de mRNA de PGC-1 α com a expressão de GAPDH nos linfonodos mesentéricos. Sham – animal laparatomizado; Pancreatite – animais submetidos à PA. n = 7.

Fig.13. Relação da expressão de mRNA de PGC-1 β com a expressão de GAPDH nos linfonodos mesentéricos. Sham – animal laparatomizado; Pancreatite – animais submetidos à PA. n = 8.

No baço, observamos diferenças significativas. A expressão de PGC-1 α manteve-se inalterada em relação aos grupos controles 2h e 24h após a pancreatite aguda. No entanto, observou-se um aumento significativo ($2,5 \pm 0,18$ vezes) da expressão deste coativador após 48h da indução da pancreatite aguda, mostrando que ocorrem alterações na expressão de PGC-1 α no baço em estágios tardios da pancreatite aguda (Fig.14).

Fig.14. Relação da expressão de mRNA de PGC-1 α com a expressão de GAPDH no Baço. Sham – animal laparatomizado; Pancreatite – animais submetidos à PA. * $p \leq 0,05$ vs Sham 48h. $n = 5$.

Em relação à expressão de PGC-1 β no baço, observamos uma diminuição significativa de sua expressão, de aproximadamente $0,61 \pm 0,21$ vezes, após 24h da indução da pancreatite aguda. Essa diminuição não se manteve nos animais que foram submetidos à pancreatite aguda e sacrificados após 48h (Fig.15).

Fig.15. Relação da expressão de mRNA de PGC-1 β com a expressão de GAPDH no baço. Sham – animal laparatomizado; Pancreatite – animais submetidos à PA.

** $p \leq 0,05$ vs Sham 24h. $n = 6$.

Nos leucócitos circulantes também observamos uma alteração importante na expressão de PGC-1 α . Nos estágios iniciais da doença, 2h e 24h, não observamos alterações em relação aos respectivos grupos controles. Entretanto, após 48h da indução da pancreatite aguda, observou-se um grande e significativo aumento da expressão do coativador PGC-1 α ($18,93 \pm 1,94$ vezes) mostrando que em estágios tardios da doença há um aumento da expressão deste coativador nos leucócitos circulantes (Fig.16).

Já a expressão de PGC-1 β mostrou-se inalterada em leucócitos circulantes nos períodos estudados após indução de pancreatite aguda (Fig.17).

Fig.16. Relação da expressão de mRNA de PGC-1 α com a expressão de GAPDH em leucócitos circulantes. Sham – animal laparatomizado; Pancreatite – animais submetidos à PA. * $p \leq 0,05$ vs Sham 48h. $n = 5$.

Fig.17. Relação da expressão de mRNA de PGC-1 β com a expressão de GAPDH nos leucócitos circulantes. Sham – animal laparatomizado; Pancreatite – animais submetidos à PA. $n = 4$.

Outra importante diferença foi observada em relação à expressão de PGC-1 α nas células do lavado peritoneal. Observamos que após 2h da

indução da pancreatite aguda, a expressão deste coativador manteve-se inalterada em relação ao seu grupo controle. Passadas 24h da indução da pancreatite aguda, a expressão de PGC-1 α aumentou significativamente ($5,59 \pm 0,98$ vezes) e esse aumento não se manteve após 48h, igualando-se à expressão de PGC-1 α do respectivo grupo controle (Fig.18).

Em relação à expressão de PGC-1 β nas células do lavado peritoneal, não foi observada alterações da expressão deste coativador em relação aos respectivos grupos controles nos períodos avaliados (Fig.19).

Fig.18. Relação da expressão de mRNA de PGC-1 α com a expressão de GAPDH nas células do lavado peritoneal. Sham – animal laparatomizado; Pancreatite – animais submetidos à PA. * $p \leq 0,05$ vs Sham 24h. $n = 5$.

Fig.19. Relação da expressão de mRNA de PGC-1 β com a expressão de GAPDH nas células do lavado peritoneal. Sham – animal laparatomizado; Pancreatite – animais submetidos à PA. n = 4.

5.5. Expressão de PGC-1 α na inflamação e na infecção

Para testar a hipótese de que ocorre um aumento da expressão de PGC-1 em presença de infecção, nós também analisamos a expressão desse gene nas células do lavado peritoneal de ratos submetidos à ligadura e perfuração cecal.

Como observado anteriormente, 24 horas após a indução de pancreatite aguda, ocorre um aumento significativo na expressão de PGC-1 α nas células peritoneais. No entanto, esse aumento é muito inferior ao aumento induzido pelo insulto bacteriano causado após a indução de CLP ($5,59 \pm 0,98$ vezes versus $25,31 \pm 1,41$ vezes, respectivamente) (fig. 20).

Fig.20. Relação da expressão relativa de mRNA de PGC-1 α em relação à expressão de GAPDH nas células do lavado peritoneal. Sham – animal laparatomizado; Pancreatite – animais submetidos à PA; CLP – animais submetidos à CLP. * $p \leq 0,05$ vs Sham 24h; # $p \leq 0,05$ vs Pancreatite 24h.. n = 5.

Esses resultados sugerem fortemente que a expressão de PGC-1 α aumentada é mais evidente na presença de um insulto bacteriano disseminado.

5.6. Expressão de PGC-1 α após tratamento com antibiótico

Com a finalidade de comprovar a modulação na expressão de PGC-1 α devido a presença de bactérias avaliamos a expressão desse gene em animais submetidos à pancreatite aguda e tratados com antibiótico imipenem. Desse modo, eliminamos a presença de bactérias devido à esperada translocação bacteriana observada nesta patologia.

Na figura 21 podemos observar que, como mostrado anteriormente, ocorre um aumento significativo da expressão de PGC-1 α nos leucócitos circulantes dos animais submetidos à pancreatite aguda após 48 horas. Esse aumento foi aproximadamente quatro vezes menor nos animais tratados com antibiótico ($23,19 \pm 2,22$ vezes versus $5,50 \pm 1,69$ vezes).

Fig.21. Relação da expressão relativa de mRNA de PGC-1 α em relação à expressão de GAPDH em leucócitos circulantes. Sham – animal laparatomizado; Pancreatite – animais submetidos à PA; Imipenem – animais submetidos à PA e tratados com imipenem. *p ≤ 0,05 vs Sham 48h; # p ≤ 0,05 vs Pancreatite 48h. n = 5.

Discussão

6. Discussão

O coativador PGC-1 α está envolvido com biogênese mitocondrial, β -oxidação de ácidos graxos e é requerido quando há necessidades energéticas (Lin et al., 2005; Finck B.N.; Kelly D.P., 2006). Assim, nosso objetivo foi analisar a expressão desse coativador em processos inflamatórios e infecciosos.

Inicialmente, mostramos que macrófagos peritoneais, após serem cultivados e ativados com estímulos infecciosos que levam à fagocitose, como o zymosan, apresentaram rapidamente um aumento da expressão de PGC-1 α (1 hora de incubação). Já na presença de estímulos inflamatórios e não infecciosos, como o LPS, observamos um aumento discreto da expressão desse coativador, porém não significativo.

Esses resultados sugerem que o aumento da expressão de PGC-1 α é devido à tentativa de suprir as necessidades energéticas demandadas pelo processo de fagocitose. A fagocitose é um processo que envolve aumento de gasto energético; segundo a maioria dos autores, porém, esse aumento é suprido pelo metabolismo glicolítico, que não depende diretamente da ação do PGC-1 (Garedew A.; Moncada S., 2008). No entanto, segundo Steinman e Cohn (1974), macrófagos inflamatórios apresentam um aumento no número de mitocôndrias o que pode ser causado pelo aumento de PGC-1 α . Nossos dados, portanto, sugerem que a ativação da via glicolítica não é suficiente em promover o aumento energético necessário à fagocitose, ou

existem outras vias de sinalização envolvidas no processo não diretamente ligadas à produção de energia.

Para determinar se existe relação causal entre aumento da expressão de PGC-1 α e fagocitose, reduzimos sua expressão através da transfecção de PGC-1 α ASO em macrófagos peritoneais de ratos em cultura. O ASO utilizado mostrou-se eficiente na redução da expressão de PGC-1 α , além de diminuir a função fagocítica dos macrófagos em relação ao grupo tratado somente com lipofectamina.

Esses dados evidenciam a importância de PGC-1 α para que a função fagocítica seja desempenhada adequadamente pelos macrófagos durante a defesa do organismo contra agentes infecciosos, pois sua ausência mostrou causar prejuízo nessa função.

Com a finalidade de verificar a relevância dos estudos acima em modelos *in vivo*, analisamos a ocorrência da modulação da expressão de PGC-1 durante processos inflamatórios e a influência de infecção bacteriana nesse processo. Para isso, utilizamos um modelo experimental de PA em que ocorre, inicialmente, inflamação asséptica, seguida por translocação bacteriana e infecção sistêmica.

PA é caracterizada por edema, necrose das células acinares, hemorragia e inflamação grave do pâncreas. Pacientes com PA apresentam-se com elevados níveis de enzimas pancreáticas digestivas no sangue e na urina, como amilase e lipase. PA grave pode levar à síndrome da resposta inflamatória sistêmica e síndrome de disfunção de múltiplos órgãos, causando alta mortalidade (Chan Y.C.; Leung P.S., 2007).

Inicialmente escolhemos e caracterizamos nosso modelo experimental. O modelo escolhido de indução de PA por perfusão do ducto foi realizado por perfusão de taurocolato de sódio (2,5%) após perfuração do duodeno e canulação da papila de Vater. Esse modelo experimental de PA é o mais popular, bem estabelecido, com vantagem de induzir rapidamente a PA, com resultados reproduzíveis e com grande similaridade com a pancreatite biliar humana (Chan Y.C.; Leung P.S., 2007).

Os procedimentos cirúrgicos são simples e terminam em torno de 15 minutos assim que a prática é adquirida. Nenhum outro órgão, exceto o pâncreas, foi afetado durante a cirurgia, evitando assim que alguns outros fatores pudessem induzir translocação bacteriana.

No entanto, existem alguns fatores que podem causar alterações nesse modelo, como a anestesia, o trauma e o estresse (Liu et al., 2009). Alguns desses vieses foram minimizados através da comparação dos animais submetidos à PA com animais sham, os quais foram submetidos aos mesmos procedimentos cirurgicos sem que houvesse perfuração do duodeno e perfusão de taurocolato de sódio.

A pancreatite é responsável por uma perturbação na barreira intestinal, permitindo que bactérias alcancem o tecido necrótico pancreático (Webster et al., 1979; Runkel et al., 1991; Tarpila et al., 1993; Gianotti et al., 1993; Widdison et al., 1994). A infecção bacteriana no pâncreas correlaciona-se com a severidade da doença em ratos e essa correlação é máxima entre 48h e 96h após a indução da pancreatite (Foitzik et al., 1994).

Alem disso, sabe-se que o modelo experimental utilizado no presente estudo induz translocação bacteriana no pâncreas e linfonodos mesentéricos em ratos após 24h da indução de PA (Yamenel et al., 2005), sendo um modelo ideal para os objetivos desse trabalho.

A determinação de amilase sérica representa o método laboratorial mais usado para diagnosticar PA (Granger J.; Remik D., 2005). Essa alteração está presente juntamente com os primeiros sintomas da doença, como podemos observar na análise realizada na figura 5. Após 2h do procedimento cirúrgico já observamos o aumento da amilase sérica, e esse aumento se manteve até 24h, mostrando que o modelo experimental induziu PA. Após 48h, os níveis de amilase sérica diminuíram o que pode ser devido à perda de função pancreática causada pela PA.

Também observamos aumento da amilase sérica após 48h nos animais sham. Acreditamos que o procedimento cirúrgico em si (laparotomia) possa ter levado a esse aumento devido ao trauma pela abertura da cavidade abdominal. No entanto, apesar desse resultado inesperado, esses animais sham não apresentavam qualquer sinal de doença, nem aumento de mortalidade, sugerindo que esse aumento possa ter sido um achado laboratorial sem relevância biológica.

Apesar de termos causado uma pancreatite grave, com alta mortalidade, nossos animais do grupo experimental só apresentaram hiperglicemia no período pós-operatório imediato. Esse resultado se deve, provavelmente, ao estresse cirúrgico a que os animais foram submetidos, uma vez que resultado semelhante foi observado nos animais sham. A

ausência de hiperglicemia em períodos mais tardios sugere que, apesar da grande destruição pancreática causada, insulina continuou a ser secretada em quantidades suficientes para não induzir gliconeogênese hepática ou diminuição de captação da glicose em tecido muscular e adiposo. Assim, qualquer alteração detectada na expressão de PGC-1 não foi causada por alterações do metabolismo de glicose.

Um ponto importante do nosso modelo experimental foi que os animais submetidos à PA apresentaram uma evolução altamente reproduzível. Nosso procedimento cirúrgico induziu PA grave, com alta mortalidade, de 30% a 50% durante as primeiras 48h. Os animais sobreviventes apresentaram-se muito doentes, piorando suas condições após 24h. Após esse período, eles também apresentaram aumento do número de leucócitos circulantes. Apesar de não termos detectado a presença de bactérias, nossos dados sugerem que a infecção estava presente 24h após a indução de PA. Assim, acreditamos que tivemos um processo inflamatório asséptico até 24h e infecção bacteriana após esse período.

Com o modelo experimental estabelecido, analisamos a expressão de ambas as isoformas de PGC-1 (α e β) em diversos órgãos dos animais submetidos à PA e animais sham por PCR em tempo real.

Os resultados obtidos pela reação de PCR em tempo real foram expressos pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ que é um meio conveniente para analisar as alterações relativas na expressão de um gene por experimentos de PCR em tempo real (Livak et al., 2001; Pfaffl et al., 2001). O padrão de expressão

relativa do gene alvo, no caso o PGC-1, foi normalizado com a expressão de um gene endógeno transcrito para compensar variações inter-PCR entre as corridas (Pfaffl et al., 2001).

Genes housekeeping estão presentes em todos os tipos de células nucleadas, pois são necessários para a sobrevivência das células. A síntese de mRNA desses genes é considerada estável e segura em diversos tecidos, até mesmo em condições de tratamentos experimentais (Marten et al., 1994; Foss et al., 1998; Thellin et al., 1999; Bhatia et al., 1994). Mas numerosos estudos mostraram que genes housekeeping são regulados e variam em condições experimentais (Bhatia et al., 1994; Bereta J.; Bereta M., 1995; Chang et al., 1998; Zhang J.; Snyder S.H., 1992). Na escolha do housekeeping ideal, para normalizar a expressão de PGC-1 α e β , 5 genes foram analisados através do software Genorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm>), mostrando que o melhor gene housekeeping para nosso estudo é o da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

Com relação à escolha dos tecidos, os pulmões foram analisados por serem os primeiros órgãos com função prejudicada após a inflamação sistêmica causada pela PA, o que pode levar à síndrome da angústia respiratória do adulto e falência respiratória (Ashbaugh et al., 1967). Estas complicações estão associadas com 60% das mortes que ocorrem dentro dos 7 primeiros dias da doença (Renner et al., 1985). Essa disfunção pulmonar é caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório no

parênquima pulmonar e é observada em 50% dos pacientes humanos com PA grave (Klöppel G.; Maillet B., 1993).

O fígado é um órgão importante na homeostase metabólica e detoxificação de substâncias tóxicas, e tem um papel crucial na resposta sistêmica a doenças críticas (Ueda et al., 1999). É conhecido por sofrer alterações histológicas e fisiológicas durante a PA (Isogai et al., 1995) e por ter um papel na produção de mediadores inflamatórios (St-Pierre et al., 2003).

Apesar das alterações que são observadas nas funções tanto dos pulmões quanto do fígado durante a PA, não observamos mudanças na expressão de PGC-1 α e β em ambos os órgãos nos períodos estudados, sugerindo que esses coativadores não estão envolvidos nas mudanças reportadas nesses órgãos durante a PA.

A não alteração da expressão de PGC-1 no fígado foi inesperada, pois acreditávamos que, por se tratar de um órgão com grande importância na homeostase metabólica e pela PA causar alterações no fígado no curso da doença, haveria um aumento da expressão de PGC-1 para induzir a gliconeogênese durante a PA.

Estudamos os linfonodos mesentéricos e o baço por se tratarem de órgãos linfóides secundários designados como um sistema de filtração e vigilância para a captura de patógenos e seus antígenos, para posterior apresentação, de maneira apropriada, às células do sistema imune (Mueller S.N.; Germain R.N., 2009). A expressão de PGC-1 α e β não apresentou qualquer alteração nos linfonodos mesentéricos, mas no baço a expressão

de PGC-1 β diminuiu 24h após a indução de PA e a expressão de PGC-1 α mostrou-se aumentada 48h após a indução de PA.

Infecções por patógenos resultam em marcadas mudanças nos órgãos linfóides secundários, muitas das quais são dirigidas para respostas do sistema imune inato e adaptativo. A migração de células do sistema imune para os linfonodos mesentéricos fica bloqueada durante dias após a infecção (Hall J.G.; Morris B., 1965), esse fato pode explicar a ausência de alterações na expressão de PGC-1 (α e β) nesse órgão.

Da mesma forma, o acúmulo de células na polpa branca do baço aumenta logo após a infecção (Mueller S.N.; Germain R.N., 2009). Durante a PA há um aumento do número de células inflamatórias no baço devido à resposta inflamatória sistêmica causada pela lesão. Curiosamente, houve uma diminuição da expressão de PGC-1 β no baço 24h após a indução de PA, o que não era esperado, uma vez que a diminuição de PGC-1 β leva à menor atividade respiratória mitocondrial e menor nível de ROS intracelular (Sonoda et al., 2007).

Além disso, observamos um aumento da expressão de PGC-1 α nas células do lavado peritoneal 24h após a indução de PA, e nos leucócitos circulantes após 48h. Esses achados podem estar relacionados com a migração direta de bactérias do cólon através da cavidade peritoneal para o pâncreas e sistema linfático (Medich et al., 1993; Tarpila et al., 1993; Widdison et al., 1990; Edmiston C.E.; Condon R.E., 1991; Runkel et al., 1991), ocorrendo passagem de bactérias primeiramente pela cavidade peritoneal.

Para testar essa hipótese nós analisamos a expressão de PGC-1 α após 24h da indução de CLP, um modelo de peritonite polimicrobiana que produz septicemia.

O modelo experimental de CLP foi estabelecido para que houvesse uma mortalidade em torno de 30% nas primeiras 24h, como estabelecido no modelo experimental de PA aqui estudado. Para essa porcentagem de mortalidade, a metodologia ideal foi a ligadura do ceco a 2,0 cm do término e 3 perfurações com agulha 30X10 mm 19G.

Nesse modelo de CLP, a expressão de PGC-1 α aumentou nas células do lavado peritoneal em comparação com os animais sham e também com os animais submetidos à PA. Em conjunto, esses resultados sugerem que a expressão de PGC-1 α é aumentada durante infecção bacteriana disseminada em maior grau quando comparado com um processo inflamatório seguido por translocação bacteriana.

Para verificar se as alterações observadas na expressão de PGC-1 α estão diretamente relacionadas com a presença de bactérias, tratamos os animais submetidos à PA com imipenem durante 48h. Em seguida, analisamos a expressão do gene em questão nos leucócitos circulantes.

Utilizamos o antibiótico imipenem por ter a capacidade de alcançar níveis suficientes no tecido pancreático e por apresentar atividade bactericida contra os micro-organismos usualmente encontrados na necrose pancreática (Beger et al., 1986; Beger et al., 1987; Banks et al., 1990; Bassi et al., 1989). Devido ao tratamento com imipenem, Büchler (1992) observou redução significativa da infecção bacteriana no pâncreas dos animais. Outro

dado importante é que o imipenem pode reduzir não só a infecção do pâncreas lesado como também de regiões extrapancreáticas, conforme observado por Foitzik e colaboradores (1995).

Como podemos observar na figura 19, o tratamento com imipenem levou à diminuição da expressão de PGC-1 α nos leucócitos circulantes após 48h de indução de PA. Esses dados sugerem que quando há diminuição da infecção bacteriana, observa-se também a diminuição da expressão de PGC-1 α , mostrando uma relação direta entre a infecção bacteriana e a expressão de PGC-1 α .

Durante a infecção, as células do sistema imune necessitam de energia para responder à infecção bacteriana. PGC-1 α está relacionado com os processos de polarização de macrófagos (Lin J.D., 2009) e com o aumento da oxidação de ácidos graxos e biogênese mitocondrial (St-Pierre et al., 2003; Sonoda et al., 2007).

O aumento da expressão de PGC-1 α após 48h da indução de PA, um estágio tardio da doença caracterizado por translocação bacteriana, pode estar relacionado ao aumento da oxidação de ácidos graxos e biogênese mitocondrial. A oxidação de ácidos graxos produz mais energia por molécula, quando comparado com a oxidação de glicose e lactato. Assim, a geração de ATP a partir da oxidação de ácidos graxos é uma fonte de energia importante para a defesa do organismo contra invasores, como no processo de fagocitose, e no reparo tecidual.

O mesmo pensamento pode ser usado para o aumento na biogênese mitocondrial. O aumento na expressão de PGC-1 α induz a biogênese

mitocondrial que, por sua vez, aumenta suprimento energético, assim as células adquirem a energia necessária para realizarem suas funções.

Para confirmar se o aumento de PGC-1 α observado nesse estudo está relacionado com aumento da oxidação de ácidos graxos e biogênese mitocondrial para suprir a demanda energética requerida para o processo de fagocitose, são necessários novos experimentos para analisar o consumo de oxigênio e a função mitocondrial.

No entanto, o aumento de PGC-1 α pode estar relacionado com alterações na resposta inflamatória per si, agindo como coativador de genes que poderiam interferir no processo de fagocitose. Nesse caso, o ideal seria a realização de microarrays para genes relacionados com a resposta inflamatória, na presença e ausência de PGC-1 α .

Em resumo, o presente estudo demonstra que durante os estágios iniciais da PA, caracterizado por um processo inflamatório não-infeccioso, não há alterações na expressão do PGC-1 α e há diminuição da expressão de PGC-1 β . No entanto, em fases posteriores da doença, em que detecta-se translocação bacteriana, observamos aumento da expressão de PGC-1 α . Este aumento foi mais pronunciado nas células da cavidade peritoneal de animais submetidos à CLP, evidenciando a relação da expressão de PGC-1 com a presença de bactérias. Já no tratamento com imipenem, em que ocorre diminuição da infecção bacteriana, observa-se diminuição da expressão de PGC-1 α . Esse gene se mostrou essencial para que ocorra o processo de fagocitose, pois sua ausência prejudicou a função fagocítica de macrófagos peritoneais em cultura.

O aumento na expressão de PGC-1 α pode ser benéfico, pois o aumento da oxidação de ácidos graxos e biogênese mitocondrial gerariam quantidades suficientes de ATP para o organismo se adaptar às necessidades fisiológicas dos tecidos, como no caso de fagocitose de organismos invasores.

O modelo experimental utilizado mimetiza a PA em humanos, no qual cerca de 80% dos pacientes apresentam evolução leve e disfunções orgânicas mínimas ou ausentes e se recuperam em poucos dias. Os outros 20% evoluem de forma grave com hipotensão arterial, choque, disfunção renal, pulmonar, íleo prolongado e sepse. A mortalidade varia desde nenhuma, nas formas leves, 10% na necrose estéril, chegando a 30% na necrose infectada (Diener J.R.C.; Rosa C.M.; Lins S., 2004).

As principais causas desta alta mortalidade são a necrose pancreática e sepse associada com síndrome da resposta inflamatória sistêmica e localizada (Banks P.A., 1997; Beger H.G.; Bittner R.; Block S.; Büchler M., 1986), e esses pacientes geralmente morrem com disfunção de múltiplos órgãos.

Um terço das mortes ocorre dentro de dias de internação, sem um foco evidente de infecção (Secchi et al., 1998). As mortes restantes ocorrem mais tardiamente e são geralmente o resultado de infecções secundárias da necrose pancreática (Tran et al., 1993) e a translocação bacteriana da flora intestinal é considerada a causa desta infecção pancreática (Beger et al., 2005).

A diferenciação precoce dos episódios de PA em formas leves e graves é importante para o seu manuseio, utilização racional dos recursos e predição de evolução e prognóstico. A comprovação da existência de infecção em um quadro de PA grave é indicação de tratamento cirúrgico (Diener J.R.C.; Rosa C.M.; Lins S., 2004) com o objetivo de remoção do tecido necrótico pancreático e peri-pancreáticos infectados (Uhl et al., 2002).

Até o momento, não existem testes capazes de discernir a inflamação asséptica sistêmica da sepse nestes pacientes. A hemocultura é o padrão-ouro, mas pode demorar pelo menos 48 horas para dar qualquer resultado. Portanto, a existência de um método rápido e confiável para diferenciar estas duas situações clínicas pode ser de grande importância. Como PGC-1 α mostrou-se aumentado em situações de presença de bactérias, acreditamos que poderia funcionar como um marcador de infecção.

Outra possível utilização é como alvo terapêutico durante processos infecciosos onde há necessidade de aumentar a atividade fagocítica e consequentemente ocorre um aumento da demanda energética. A indução de PGC-1 α poderia auxiliar no aumento de energia disponível para a realização efetiva do processo de fagocitose e manutenção da homeostase celular.

Conclusões

7. Conclusões

- O tratamento de macrófagos peritoneais com estímulos infecciosos que ativam a fagocitose induziu rapidamente a expressão de PGC-1 α ;
- A diminuição da expressão de PGC-1 α , causada pela transfecção de ASO, prejudicou o processo de fagocitose, mostrando uma relação causal entre a efetivação desse processo e a expressão de PGC-1 α ;
- Em estágios posteriores da PA a expressão de PGC-1 α apresentou-se aumentada em leucócitos circulantes, células do lavado peritoneal e no baço;
- Na presença de infecção grave, como na cavidade peritoneal dos animais submetidos à CLP, o aumento de PGC-1 α foi mais pronunciado;
- Quando ocorreu redução da infecção bacteriana, pela administração de imipenem, observou-se diminuição da expressão de PGC-1 α .

Referências

8. Referências Bibliográficas

- Ammori BJ. Role of the gut in the course of severe acute pancreatitis. *Pancreas*. 2003; 26:122–129.
- Andersson R, Wang XD. Significance of gut barrier dysfunction in the development of MODS. *J Organ Dysfunction*. 2005.
- Andersson U, Scarpulla RC. Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 2001; 21(11):3738-49.
- Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 1967; 2(7511):319-23.
- Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, Kelly DP, Hollozy JO. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J*. 2002; 16: 1879-1886.
- Babior, B. M. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*. 2004; 16(1): 42-7.
- Banks PA, Gerzof SG, Chong FK, Worthington MG, Doos WG, Sullivan JG, Johnson WC. Bacteriologic status of necrotic tissue in necrotizing pancreatitis. *Pancreas*. 1990; 5(3):330-3.
- Banks PA. Practice guidelines in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol*. 1997; 92(3):377-86.
- Bassi C, Falconi M, Girelli R, et al. Microbiological findings in severe pancreatitis. *Surg Res Commun*. 1989; 5: 1-4.
- Beger HG, Bittner R, Block S, Büchler M. Bacterial contamination of pancreatic necrosis. A prospective clinical study. *Gastroenterology*. 1986; 91(2):433-8.
- Beger HG, Block S, Bittner R. The significance of bacterial infection in acute pancreatitis. In Beger HG, Büchler M, eds. *Acute Pancreatitis*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. 1987; 79-86.
- Beger HG, Rau B, Isenmann R, Schwarz M, Gansauge F, Poch B. Antibiotic prophylaxis in severe acute pancreatitis. *Pancreatol*. 2005; 5(1):10-9.
- Beger HG, Rau B, Mayer J, Pralle U. Natural course of acute pancreatitis. *World J Surg*. 1997; 21(2):130-5.

Bereta J, Bereta M. Stimulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA levels by endogenous nitric oxide in cytokine-activated endothelium. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 217(1):363-9.

Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol*. 2000; 190(2):117-25.

Bhatia P, Taylor WR, Greenberg AH, Wright JA. Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Anal Biochem*. 1994; 216(1):223-6.

Bouwens L, Baekeland M, De Zanger R, Wisse E. Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology*. 1986; 6(4):718-22.

Büchler M, Malfertheiner P, Friess H, Isenmann R, Vanek E, Grimm H, Schlegel P, Friess T, Beger HG. Human pancreatic tissue concentration of bactericidal antibiotics. *Gastroenterology*. 1992; 103(6):1902-8.

Cartmell MT, Kingsnorth AN. Acute pancreatitis. *Hosp Med*. 2000; 61(6):382-5.

Chan YC, Leung PS. Acute pancreatitis: animal models and recent advances in basic research. *Pancreas*. 2007; 34(1):1-14.

Chang TJ, Juan CC, Yin PH, Chi CW, Tsay HJ. Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma. *Oncol Rep*. 1998; 5(2):469-71.

Cicalese L, Sahai A, Sileri P, Rastellini C, Subbotin V, Ford H, Lee K. Acute pancreatitis and bacterial translocation. *Dig Dis Sci*. 2001; 46:1127–1132.

Clayton DA. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Cell Biol*. 1991; 7:453–478.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002; 420(6917): 885-91.

Croce MA, Eagon JC, LaRiviere LL, Korenblat KM, Klein S, Finck BN. Hepatic lipin 1beta expression is diminished in insulin-resistant obese subjects and is reactivated by marked weight loss. *Diabetes*. 2007; 56: 2395-2399.

Crunkhorn S, Dearie F, Mantzoros C, Gami H, da Silva WS, Espinoza D, Faucette R, Barry K, Bianco AC, Patti ME. Peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1 expression is reduced in obesity: potential pathogenic role of saturated fatty acids and p38 mitogen-activated protein

kinase activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282: 15439-15450.

Daitoku H, Yamagata K, Matsuzaki H, Hatta M, Fukamizu A. Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. *Diabetes*. 2003; 52: 642-649.

Dervenis C, Johnson CD, Bassi C, Bradley E, Imrie CW, McMahon MJ, Modlin I. Diagnosis, objective assessment of severity, and management of acute pancreatitis. Santorini consensus conference. *Int J Pancreatol*. 1999; 25(3):195-210.

Dervenis C, Smailis D, Hatzitheoklitos E. Bacterial translocation and its prevention in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2003; 10:415-418.

Diener JRC, Rosa CM, Lins S. Avanços no manuseio da Pancreatite aguda. *RBTI*. 2004; 261-265.

Eddy SF, Storey KB. Differential expression of Akt, PPAR γ , and PGC-1 during hibernation in bat. *Biochem. Cell Biol*. 2003; 81: 269-274.

Edmiston CE Jr, Condon RE. Bacterial translocation. *Surg Gynecol Obstet*. 1991; 173(1):73-83.

Ehrt S, Schnappinger D, Bekiranov S, Drenkow J, Shi S, Gingeras TR, Gaasterland T, Schoolnik G, Nathan C. Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and Mycobacterium tuberculosis: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *J Exp Med*. 2001; 194(8):1123-40.

Eubanks JW 3rd, Sabek O, Kotb M, Gaber LW, Henry J, Hijiya N, Britt LG, Gaber AO, Goyert SM. Acute pancreatitis induces cytokine production in endotoxin-resistant mice. *Ann Surg*. 1998; 227(6):904-11.

Feingold KR, Moser A, Patsek SM, Shigenaga JK, Grunfeld C. Infection decreases fatty acid oxidation and nuclear hormone receptors in the diaphragm. *J Lipid Res*. 2009.

Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest*. 2006; 116(3):615-22.

Foitzik T, Fernández-del Castillo C, Ferraro MJ, Mithöfer K, Rattner DW, Warshaw AL. Pathogenesis and prevention of early pancreatic infection in experimental acute necrotizing pancreatitis. *Ann Surg.* 1995;222(2):179-85.

Foitzik T, Mithöfer K, Ferraro MJ, Fernández-del Castillo C, Lewandrowski KB, Rattner DW, Warshaw AL. Time course of bacterial infection of the pancreas and its relation to disease severity in a rodent model of acute necrotizing pancreatitis. *Ann Surg.* 1994; 220(2):193-8.

Folch E, Gelpí E, Roselló-Catafau J, Closa D. Free radicals generated by xanthine oxidase mediate pancreatitis-associated organ failure. *Dig Dis Sci.* 1998; 43(11):2405-10.

Folch-Puy E. Importance of the liver in systemic complications associated with acute pancreatitis: the role of Kupffer cells. *J Pathol.* 2007; 211(4):383-8.

Foss DL, Baarsch MJ, Murtaugh MP. Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Anim Biotechnol.* 1998;9(1):67-78.

Funk JL, Feingold KR, Moser AH, Grunfeld C. Lipopolysaccharide stimulation of RAW 264.7 macrophages induces lipid accumulation and foam cell formation. *Atherosclerosis.* 1993; 98(1):67-82.

Garedew A, Moncada S. Mitochondrial dysfunction and HIF1alpha stabilization in inflammation. *J Cell Sci.* 2008; 121(Pt 20):3468-75.

Geng T, Li P, Okutsu M, Yin X, Kwek J, Zhang M, Yan Z. PGC-1 α plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not in fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010; 298: C572-C578.

Gianotti L, Munda R, Alexander JW, Tchervenkov JI, Babcock GF. Bacterial translocation: a potential source for infection in acute pancreatitis. *Pancreas.* 1993; 8(5):551-8.

Goto M, Terada S, Kato M, Katoh M, Yokozeki T, Tabata I, Shimokawa T. cDNA cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 274: 350-354.

Guan H.P., T. Ishizuka, P.C. Chui, M. Lehrke and M.A. Lazar, Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes, *Genes Dev.* 2005; 19: 453–461.

Granger J, Remick D. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators. *Shock*. 2005; 24 Suppl 1:45-51.

Grewal HP, Kotb M, el Din AM, Ohman M, Salem A, Gaber L, Gaber AO. Induction of tumor necrosis factor in severe acute pancreatitis and its subsequent reduction after hepatic passage. *Surgery*. 1994; 115(2):213-21.

Guidet B, Aegerter P, Gauzit R, Meshaka P, and Dreyfuss D. Incidence and impact of organ dysfunctions associated with sepsis. *Chest*. 2005; 127: 942-951.

Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell*. 2004; 119(6):753-66.

Hall JG, Morris B. The immediate effect of antigens on the cell output of a lymph node. *Br. J. Exp. Pathol* 1965;46:450–454.

Handschin C, Chin S, Li P, Liu F, Maratos-Flier E, Lebrasseur NK, Yan Z, Spiegelman BM. Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. *J Biol Chem*. 2007; 282(41):30014–30021.

Handschin C, Choi CS, Chin S, Kim S, Kawamori D, Kurpad AJ, Neubauer N, Hu J, Mootha VK, Kim YB, Kulkarni RN, Shulman GI, Spiegelman BM. Abnormal glucose homeostasis in skeletal muscle-specific PGC-1alpha knockout mice reveals skeletal muscle-pancreatic beta cell crosstalk. *J Clin Invest*. 2007; 117(11):3463–3474.

Herscovitz HB, Holden HT, Bellanti JA, Ghafar A. Manual of macrophage methodology. New York: Marcel Dekker. 1981; 299 p.

Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B, Montminy M. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*. 2001; 413: 179-183.

Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med*. 1999; 27(7): 1230-51.

Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003; 348(2): 138-50.

Hughes CB, Gaber LW, Kotb M, Mohey el-Din AB, Pabst M, Gaber AO. Induction of acute pancreatitis in germ-free rats: evidence of a primary role for tumor necrosis factor-alpha. *Surgery*. 1995; 117(2):201-5.

Isaji S, Mizuno S, Tabata M, Yamagiwa K, Yokoi H, Uemoto S. Bacterial analysis of infected pancreatic necrosis and its prevention (Symposium 8: Pancreatobiliary infection (IHPBA)). *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2003; 10:419–424.

Isogai M, Yamaguchi A, Hori A, Nakano S. Hepatic histopathological changes in biliary pancreatitis. *Am J Gastroenterol.* 1995; 90(3):449-54.

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20: 197-216.

Johnson CD, Kingsnorth AN, Imrie CW, McMahon MJ, Neoptolemos JP, McKay C, Toh SK, Skaife P, Leeder PC, Wilson P, Larvin M, Curtis LD. Double blind, randomised, placebo controlled study of a platelet activating factor antagonist, lexipafant, in the treatment and prevention of organ failure in predicted severe acute pancreatitis. *Gut.* 2001; 48(1):62-9.

Johnston RBJr. Enhancement of phagocytosis-associated oxidase metabolism as a manifestation of macrophage activation. *Lymphokines.* 1981; 3:33-56.

Kamei Y, Ohizumi H, Fujitani Y, Nemoto T, Tanaka T, Takahashi N, Kawada T, Miyoshi M, Ezaki O, Kakizuka A. PPARgamma coactivator 1beta/ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100:12378–12383.

Khovidhunkit W, Kim MS, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res.* 2004; 45(7):1169-96

Klar E, Messmer K, Warshaw AL, Herfarth C. Pancreatic ischaemia in experimental acute pancreatitis: mechanism, significance and therapy. *Br J Surg.* 1990; 77:1205–1210.

Klöppel G, Maillet B. Pathology of acute and chronic pancreatitis. *Pancreas.* 1993; 8(6):659-70.

Koves TR, Li P, An J, Akimoto T, Slentz D, Ilkayeva O, Dohm GL, Yan Z, Newgard CB, Muoio DM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1alpha-mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency. *J Biol Chem.* 2005; 280: 33588-33598.

Knutti D., Kressler D., Kralli A., Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; 98: 9713–9718.

Knutti R, Flückiger J, Stocker TF, Timmermann A. Strong hemispheric coupling of glacial climate through freshwater discharge and ocean circulation. *Nature*. 2004; 430(7002):851-6.

Kressler D, Schreiber SN, Knutti D, Kralli A. The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha. *J Biol Chem*. 2002; 277(16):13918-25. Epub 2002 Feb 19.

Kuhl JE, Ruderman NB, Musi N, Goodyear LJ, Patti ME, Crunkhorn S, Dronamraju D, Thorell A, Nygren J, Ljungkvist O, Degerblad M, Stahle A, Brismar TB, Andersen KL, Saha AK, Efendic S, Bavenholm PN. Exercise training decreases the concentration of malonyl-CoA and increases the expression and activity of malonyl-CoA decarboxylase in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 290: E1296-E1303.

Kusske AM, Rongione AJ, Reber HA. Cytokines and acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 1996;110:639–642.

Lehman M, Silver R. CSF signaling in physiology and behavior. *Prog Brain Res*. 2000; 125:415-33.

Li X, Monks B, Ge Q, Birnbaum MJ. Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC01alpha transcription coactivator. *Nature*. 2007; 447: 1012-1016.

Lien E, Ingalls RR. Toll-like receptors. *Crit Care Med*. 2002; 30(1Suppl): S1-11.

Lien E, Means TK, et al. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest*. 2000; 105(4): 497-504.

Lin JD. Minireview: the PGC-1 coactivator networks: chromatin-remodeling and mitochondrial energy metabolism. *Mol Endocrinol*. 2009; 23(1):2-10.

Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator 1 β (PGC-1 β), a novel PGC-1 related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem*. 2002; 277:1645–1648.

Lin J., Tarr P.T., Yang R., Rhee J., Puigserver P., Newgard C.B, Spiegelman B.M. PGC-1beta in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism, *J. Biol. Chem*. 2003; 278:30843–30848.

Lin J, Yang R, Tarr PT, Wu PH, Pei L, Uldry M, Tontonoz P, Newgard CB, Spiegelman BM. Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1 β coactivation of SREBP. *Cell*. 2005; 120:261–273.

Lira VA, Benton CR, Yan Z, Bonen A. PGC-1 α regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010; 299: E145-161.

Liu HB, Cui NQ, Li DH, Chen C. Role of Kupffer cells in acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis-associated lung injury of rats. *World J Gastroenterol*. 2006; 12(3):403-7.

Liu ZH, Peng JS, Li CJ, Yang ZL, Xiang J, Song H, Wu XB, Chen JR, Diao DC. A simple taurocholate-induced model of severe acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol*. 2009; 15(45):5732-9.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4):402-8.

Loike JP, Kozler YF, Silverstein SC. Increased ATP and creatine phosphate turnover in phagocytosing mouse peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem*. 1979; 254:9558.

Kim J.B., Spiegelman B.M., ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism, *Genes Dev*. 1996; 10:1096–1107.

MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie QW, Sokol K, Hutchinson N, et al. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell*. 1995; 81(4):641-50.

MacMicking JD, Taylor GA, McKinney JD. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science*. 2003; 302(5645):654-9.

Marten NW, Burke EJ, Hayden JM, Straus DS. Effect of amino acid limitation on the expression of 19 genes in rat hepatoma cells. *FASEB J*. 1994; 8(8):538-44.

Mayer JM, Raraty M, Slavin J, Kemppainen E, Fitzpatrick J, Hietaranta A, Puolakkainen P, Beger HG, Neoptolemos JP. Serum amyloid A is a better early predictor of severity than C-reactive protein in acute pancreatitis. *Br J Surg*. 2002; 89:163–171.

McKay CJ, Evans S, Sinclair M, Carter CR, Imrie CW. High early mortality rate from acute pancreatitis in Scotland, 1984-1995. *Br J Surg.* 1999; 86(10):1302-5.

Medich DS, Lee TK, Melhem MF, Rowe MI, Schraut WH, Lee KK. Pathogenesis of pancreatic sepsis. *Am J Surg.* 1993; 165(1):46-50; discussion 51-2.

Medzhitov R, Janeway Jr C. Innate immunity. *N Engl J Med.* 2000; 343(5): 338-44.

Meirhaeghe A, Crowley V, Lenaghan C, Lelliott C, Green K, Stewart A, Hart K, Schinner S, Sethi JK, Yeo G, Brand MD, Cortright RN, O'Rahilly S, Montague C, Vidal-Puig AJ. Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo. *Biochem J.* 2003; 373(Pt 1):155-65.

Migita K, Abiru S, Nakamura M, Komori A, Yoshida Y, Yokoyama T, Daikoku M, Ueki T, Takii Y, Yano K, Yastuhashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Lipopolysaccharide signaling induces serum amyloid A (SAA) synthesis in human hepatocytes in vitro. *FEBS Lett.* 2004; 569(1-3):235-9.

Miwa S., Brand M.D. Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling, *Biochem. Soc. Trans.* 2003; 31:1300–1301.

Mortensen OH, Frandsen L, Schjerling P, Nishimura E, Grunnet N. PGC-1 α and PGC-1 β have both similar and distinct effects on myofiber switching toward an oxidative phenotype. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006; 291: E807-E816.

Mueller SN, Germain RN. Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9(9):618-29.

Murakami H, Nakao A, Kishimoto W, Nakano M, Takagi H. Detection of O₂-generation and neutrophil accumulation in rat lungs after acute necrotizing pancreatitis. *Surgery.* 1995; 118:547–554.

Mutinga M, Rosenbluth A, Tenner SM, Odze RR, Sica GT, Banks PA. Does mortality occur early or late in acute pancreatitis? *Int J Pancreatol.* 2000; 28(2):91-5.

Nakae Y, Naruse S, Kitagawa M, Hirao S, Yamamoto R, Hayakawa T. Activation of trypsinogen in experimental models of acute pancreatitis in rats. *Pancreas.* 1995; 10(3):306-13.

Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med*. 1983; 158(3):670-89.

Neoptolemos JP, Raraty M, Finch M, Sutton R. Acute pancreatitis: the substantial human and financial costs. *Gut*. 1998; 42(6):886-91.

Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*. 2003; 299: 896-899.

Nisoli E, Falcone S, Tonello C, Cozzi V, Palomba L, Fiorani M, Pisconti A, Brunelli S, Cardile A, Francolini M, Cantoni O, Carruba MO, Moncada S, Clementi E. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondrial in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 16507-16512.

Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science*. 2005; 310: 314-317.

Norman JG, Fink GW, Franz MG. Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. *Arch Surg*. 1995; 130(9):966-70.

Norman JG, Franz MG, Riker A, Gower WR. Rapid elevation of cytokines during acute pancreatitis and their origination within the pancreas. *Surgical Forum*. 1994; 45:148-160.

Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock*. 2001; 16(2): 83-96.

Oberkofler H, Schraml E, Krempler F, Patsch W. Potentiation of liver X receptor transcriptional activity by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha. *Biochem J*. 2003; 371(Pt 1):89-96.

Ogawa M. Acute pancreatitis and cytokines: "second attack" by septic complication leads to organ failure. *Pancreas*. 1998; 16(3):312-5.

Parisi M.A., Clayton D.A. Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins, *Science*. 1991; 252: 965-969.

Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, Miyazaki Y, Kohane I, Costello M, Saccone R, Landaker EJ, Goldfine AB, Mun E, DeFronzo R, Finlayson J, Kahn CR, Mandarino LJ. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and

diabetes: potential role of PGC-1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 8466-8471.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29(9):e45.

Physicians ACoC. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*. 1992; 20(6): 864-74.

Pilegaard P, Saltin B, Neufer PD. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. *J Physiol*. 2003; 546: 851-858.

Pooran N, Indaram A, Singh P, Bank S. Cytokines (IL-6, IL-8, TNF): early and reliable predictors of severe acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2003; 37:263–266.

Puigserver P, Adelmant G, Wu Z, Fan M, Xu J, O'Malley B, Spiegelman BM. Activation of PPAR γ coactivator-1 through transcription factor docking. *Science*. 1999; 286(5443):1368-71.

Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction. *Nature*. 2003; 423(6939):550-5.

Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY, Krauss S, Mootha VK, Lowell BB, Spiegelman BM. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPAR γ coactivator-1. *Mol Cell*. 2001; 8(5):971-82.

Qiao SF, Lu TJ, Sun JB, Li F. Alterations of intestinal immune function and regulatory effects of L-arginine in experimental severe acute pancreatitis rats. *World J Gastroenterol*. 2005; 11:6216–6218.

Raraty MG, Connor S, Criddle DN, Sutton R, Neoptolemos JP. Acute pancreatitis and organ failure: pathophysiology, natural history, and management strategies. *Curr Gastroenterol Rep*. 2004; 6(2):99-103.

Rau B, Pralle U, Uhl W, Schoenberg MH, Beger HG. Management of sterile necrosis in instances of severe acute pancreatitis. *J Am Coll Surg*. 1995; 181(4):279-88.

Renner IG, Savage WT 3rd, Pantoja JL, Renner VJ. Death due to acute pancreatitis. A retrospective analysis of 405 autopsy cases. *Dig Dis Sci*. 1985; 30(10):1005-18.

Richardson DK, Kashyap S, Bajaj M, Cusi K, Mandarino SJ, Finlayson J, Defronzo RA, Jenkinson CP, Mandarino LJ. Lipid infusion decreases the expression of nuclear encoded mitochondrial genes and increases the expression of extracellular matrix genes in human skeletal muscle. *J Biol Chem*. 2005; 280: 10290-10297.

Rinderknecht H. Genetic determinants of mortality in acute necrotizing pancreatitis. *Int J Pancreatol*. 1994; 16:11–15.

Rhee J, Inoue Y, Yoon JC, Puigserver P, Fan M, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(7):4012-7.

Runkel NS, Moody FG, Smith GS, Rodriguez LF, LaRocco MT, Miller TA. The role of the gut in the development of sepsis in acute pancreatitis. *J Surg Res*. 1991; 51(1):18-23.

Russell AP, Feilchenfeldt J, Schreiber S, Praz M, Crettenand A, Gobelet C, Meier CA, Bell DR, Kralli A, Giacobino JP, Deriaz O. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes*. 2003; 52: 2874-2881.

Russell AP, Hesselink MK, Lo SK, Schrauwen P. Regulation of metabolic transcriptional co-activators and transcriptional factors with acute exercise. *FASEB J*. 2005; 19: 986-988.

Saad B, Frei K, Scholl FA, Fontana A, Maier P. Hepatocyte-derived interleukin-6 and tumor-necrosis factor alpha mediate the lipopolysaccharide-induced acute-phase response and nitric oxide release by cultured rat hepatocytes. *Eur J Biochem*. 1995; 229(2):349-55.

Sakorafas GH, Tsiotou AG. Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis: current concepts. *J Clin Gastroenterol*. 2000; 30(4):343-56.

Sanfey H, Bulkley GB, Cameron JL. The pathogenesis of acute pancreatitis. The source and role of oxygen-derived free radicals in three different experimental models. *Ann Surg*. 1985; 201:633–639.

- Scarpulla RC. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1576(1-2):1-14.
- Secchi M, Raimundo G, Quadrelli L, Tagliaferri E, Brogliatti M, Nosti A. Fulminant pancreatitis. *Br J Surg*. 1998; 85:80.
- Shin DJ, Campos JA, Gil G, Osborne TF. PGC-1alpha activates CYP7A1 and bile acid biosynthesis. *J Biol Chem*. 2003; 278(50):50047-52.
- Sonoda J, Laganière J, Mehl IR, Barish GD, Chong LW, Li X, Scheffler IE, Mock DC, Bataille AR, Robert F, Lee CH, Giguère V, Evans RM. Nuclear receptor ERR alpha and coactivator PGC-1 beta are effectors of IFN-gamma-induced host defense. *Genes Dev*. 2007; 21(15):1909-20.
- Souza LJ, Sampietre SN, Figueiredo S, Yria Y, Machado MCC, Pinotti HW. Translocação bacteriana na pancreatite aguda. Estudo experimental em ratos. *Ver. Hops. Clin. Fac. Med. S. Paulo*. 1996; 51(4):116-120.
- Sparks LM, Xie H, Koza RA, Mynatt R, Hulver MW, Bray GA, Smith SR. A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes*. 2005; 54: 1926-1933.
- Spiegelman BM, Heinrich R. Biological control through regulated transcriptional coactivators. *Cell*. 2004; 119(2):157-67.
- Steinman RM, Cohn ZA. The metabolism and physiology of the mononuclear phagocytes. In *The Inflammatory Process*, ed. BW Zweifach, L Grant, RT McCluskey. 1:449 - 510. NY: Academic. 2nd ed. 1974.
- Stenberg w, Tenner S. Acute Pancreatitis. *N Engl J Med*. 1994;330:1198-210.
- Stephens KE, Ishizaka A, Larrick JW, Raffin TA. Tumor necrosis factor causes increased pulmonary permeability and edema. Comparison to septic acute lung injury. *Am Rev Respir Dis*. 1988;137:1364–1370.
- St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB, Spiegelman BM. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J Biol Chem*. 2003; 278(29):26597-603.
- Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg*. 1996; 20:411–417.
- Tarpila E, Nyström PO, Franzén L, Ihse I. Bacterial translocation during acute pancreatitis in rats. *Eur J Surg*. 1993; 159(2):109-13.

Terada S, Goto M, Kato M, Kawanaka K, Shimokawa T, Tabata I. Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 296: 350-354.

Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*. 1999; 75(2-3):291-5.

Timmons JA, Norrbom J, Scheele C, Thonberg H, Wahlestedt C, Tesch P. Expression profiling following local muscle inactivity in humans provides new perspective on diabetes-related genes. *Genomics*. 2006; 87: 165-172.

Tran DD, Cuesta MA, Schneider AJ, Wesdorp RI. Prevalence and prediction of multiple organ system failure and mortality in acute pancreatitis. *J Crit Care*. 1993; 8(3):145-53.

Tsuji N, Watanabe N, Okamoto T, Niitsu Y. Specific interaction of pancreatic elastase and leucocytes to produce oxygen radicals and its implication in pancreatitis. *Gut*. 1994; 35:1659–1664.

Ueda T, Ho HS, Anderson SE, Takeyama Y. Pancreatitis-induced ascitic fluid and hepatocellular dysfunction in severe acute pancreatitis. *J Surg Res*. 1999; 82(2):305-11.

Uhl W, Büchler MW, Malfertheiner P, Beger HG, Adler G, Gaus W. A randomised, double blind, multicentre trial of octreotide in moderate to severe acute pancreatitis. *Gut*. 1999; 45(1):97-104.

Uhl W, Warshaw A, Imrie C, Bassi C, McKay CJ, Lankisch PG, Carter R, Di Magno E, Banks PA, Whitcomb DC, Dervenis C, Ulrich CD, Satake K, Ghaneh P, Hartwig W, Werner J, McEntee G, Neoptolemos JP, Büchler MW; International Association of Pancreatology. IAP Guidelines for the Surgical Management of Acute Pancreatitis. *Pancreatology*. 2002; 2(6):565-73.

Vats, D., L. Mukundan, et al. Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab*. 2006; 4(1): 13-24.

Vega RB, Huss JM, Kelly DP. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor α in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol*. 2000; 20(5):1868-76.

Virbasius J.V., Scarpulla R.C. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994; 91:1309–1313.

Visconti M, Rabitti PG, Uomo G, Giannattasio F, Varriale M, Russo C. The multiple-organ failure syndrome in acute pancreatitis. Its pathogenesis and treatment. *Recenti Prog Med*. 1995;86:81–85.

Wang XD, Deng XM, Haraldsen P, Andersson R, Ihse I. Antioxidant and calcium channel blockers counteract endothelial barrier injury induced by acute pancreatitis in rats. *Scand J Gastroenterol*. 1995; 30:1129–1136.

Webster MW, Pasculle AW, Myerowitz RL, Rao KN, Lombardi B. Postinduction bacteremia in experimental acute pancreatitis. *Am J Surg*. 1979; 138(3):418-20.

Weitzel JM, Radtke C, Seitz HJ. Two thyroid hormone-mediated gene expression patterns in vivo identified by cDNA expression arrays in rat. *Biol Reprod*. 2003; 68(2):699-707.

Whicher JT, Barnes MP, Brown A, Cooper MJ, Read R, Walters G, Williamson RC. Complement activation and complement control proteins in acute pancreatitis. *Gut*. 1982; 23(11):944-50.

Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res*. 1980; 29(2):189-201.

Widdison AL, Karanjia ND, Reber HA. Routes of spread of pathogens into the pancreas in a feline model of acute pancreatitis. *Gut*. 1994;35(9):1306-10.

Wilson PG, Manji M, Neoptolemos JP. Acute pancreatitis as a model of sepsis. *J Antimicrob Chemother*. 1998; 41 Suppl A:51-63.

Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*. 1999; 98(1):115-24.

Yamanel L, Mas MR, Comert B, Isik AT, Aydin S, Mas N, Deveci S, Ozyurt M, Tasci I, Unal T. The effect of activated protein C on experimental acute necrotizing pancreatitis. *Crit Care*. 2005; 9(3):R184-90.

Yoon J.C., Puigserver P., Chen G., Donovan J., Wu Z., Rhee J., Adelmant G., Stafford J., Kahn C.R., Granner D.K. et al. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1, *Nature*. 2001; 413:131–138.

Zhang J, Snyder SH. Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89(20):9382-5.

Zhang Y, Castellani LW, Sinal CJ, Gonzalez FJ, Edwards PA. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev*. 2004; 18(2):157-69.

Zhao H, Zhao X, Bai CX, Wang XD. Potential factors of interorgan signals in the development of pancreatitis-associated acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *J Organ Dysfunction*. 2005; 1:32-44.