

## Alterações na Produção de IL-10 e TNF- $\alpha$ no Músculo Esquelético em Ratos com Insuficiência Cardíaca Secundária ao Infarto do Miocárdio

*Changes in the Production of IL-10 and TNF- $\alpha$  in Skeletal Muscle of Rats with Heart Failure Secondary to Acute Myocardial Infarction*

Renato Delacio Lopes<sup>2,3</sup>, Miguel Luiz Batista Júnior<sup>1</sup>, José Cesar Rosa<sup>1</sup>, Fabio Santos de Lira<sup>1</sup>, Eivor Martins Jr<sup>1</sup>, Alex Yamashita Shimura<sup>1</sup>, Patrícia Chakur Brum<sup>1</sup>, Antonio Herbert Lancha Jr<sup>1</sup>, Marília C. L. Seelaender<sup>1</sup>, Antonio Carlos Lopes<sup>2</sup>

Universidade de São Paulo<sup>1</sup>, São Paulo; Universidade Federal de São Paulo<sup>2</sup>; Universidade de Mogi das Cruzes<sup>3</sup>, Mogi das Cruzes; Duke Clinical Research Institute<sup>4</sup>, Durham- North Caroline, USA

### Resumo

**Fundamento:** Estudos recentes demonstram que a expressão de mediadores inflamatórios, como as citocinas, é um importante fator de desenvolvimento e progressão da insuficiência cardíaca (IC), principalmente na presença de disfunção ventricular esquerda. Essas alterações têm sido demonstradas tanto no plasma como no músculo cardíaco e, mais recentemente, no músculo esquelético de ratos e pacientes com IC.

**Objetivo:** Investigar a produção e expressão do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-10 (IL-10) no músculo sóleo e extensor digital longo (EDL) em animais com disfunção ventricular pós-infarto do miocárdio (IM).

**Métodos:** Utilizaram-se ratos Wistar machos que foram submetidos à ligadura da artéria coronária esquerda sem posterior reperfusão. Quatro semanas após esse procedimento, os animais foram submetidos à análise ecocardiográfica e divididos nos seguintes grupos experimentais: falso operado (Sham) e IM. Mantiveram-se em observação por um período adicional de 8 semanas.

**Resultados:** O nível da citocina TNF- $\alpha$  aumentou 26,5% ( $p < 0,05$ ), e sua expressão gênica, 3 vezes ( $p < 0,01$ ). O nível de IL-10 apresentou diminuição de 38,2% ( $p < 0,05$ ). Ambas as alterações ocorreram apenas no músculo sóleo, sem alterações no EDL. A diminuição (36,5%,  $p < 0,05$ ) na razão IL-10/ TNF- $\alpha$  deveu-se tanto ao aumento dos níveis teciduais do TNF- $\alpha$  quanto à diminuição da IL-10 dos níveis teciduais.

**Conclusão:** Nossos resultados demonstraram alterações relevantes na razão IL-10/ TNF- $\alpha$ , o que pode ter um papel aditivo na avaliação da deterioração e progressão do quadro da disfunção ventricular esquerda pós-IM. Além disso, nosso estudo sugere que essas alterações parecem estar relacionadas ao tipo de fibra muscular. (Arq Bras Cardiol 2010; 94(3):313-320)

**Palavras-chave:** Disfunção ventricular esquerda, músculo esquelético, citocinas, inflamação.

### Abstract

**Background:** Recent studies show that the expression of inflammatory mediators, such as cytokines, is an important factor for the development and progression of heart failure (HF), especially in the presence of left ventricular dysfunction. These changes have been demonstrated both in the plasma and heart muscle and, more recently, in skeletal muscle of rats and in patients with HF.

**Objective:** To investigate the production and expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF) and interleukin-10 (IL-10) in the soleus and the extensor digitorum longus (EDL) muscles of animals with left ventricular dysfunction after myocardial infarction (MI).

**Methods:** We used male Wistar rats that underwent ligation of the left coronary artery without reperfusion. Four weeks after this procedure, the animals underwent echocardiography and were divided into the following experimental groups: sham operated (sham) and IM. They remained under observation for a further period of 8 weeks.

**Results:** The level of the cytokine TNF- $\alpha$  increased by 26.5% ( $p < 0.05$ ), and its gene expression increased 3 times ( $p < 0.01$ ). The level of IL-10 decreased by 38.2% ( $p < 0.05$ ). Both changes occurred only in the soleus muscle, with no change in the EDL. The decrease (36.5%,  $p < 0.05$ ) in the IL-10/TNF- $\alpha$  ratio was due to both increased tissue levels of TNF- $\alpha$  and decreased tissue levels of IL-10.

**Conclusion:** Our results showed significant changes in the IL-10/TNF- $\alpha$  ratio, which may have an additive role in the assessment of deterioration and progression of left ventricular dysfunction post-MI. Furthermore, our study suggests that these changes seem to be related to the muscle fiber type. (Arq Bras Cardiol 2010; 94(3):293-300)

**Key Words:** Ventricular dysfunction, left; muscle, skeletal; cytokines; inflammation.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Miguel Luiz Batista Júnior •

Av. Lineu Prestes, 1524 - 05508-900 - Butantã - São Paulo, SP - Brasil.

E-mail: migueljr@usp.br

Artigo recebido em 15/04/09; revisado recebido em 14/07/09; aceito em 12/08/09

## Introdução

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica de fisiopatologia complexa que pode ser resultante de qualquer disfunção funcional ou estrutural que atinja o coração e, conseqüentemente, comprometa a capacidade dos ventrículos de encherem e bombearem sangue satisfatoriamente<sup>1,2</sup>. As manifestações cardinais da IC são dispneia e fadiga, as quais podem limitar a capacidade de realização de esforço físico (intolerância ao exercício físico) e culminar em processos que levem à congestão pulmonar e sistêmica e ao aumento da resistência vascular periférica<sup>1,3</sup>. As principais causas da IC, de origem cardíaca, são as doenças das artérias coronárias, hipertensão, cardiomiopatias dilatadas e doenças das valvas cardíacas<sup>1,4</sup>.

Atualmente, as alterações deteriorativas envolvidas na progressão da IC com disfunção ventricular não dependem somente dos parâmetros hemodinâmicos, mas também dos processos que culminam na ativação inflamatória local (coração) e sistêmica<sup>5-7</sup>, evidenciadas pelo aumento, tanto na expressão gênica como na proteica, de citocinas pró-inflamatórias, tais como: fator  $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e 6 (IL-6), entre outras. Essas alterações têm sido demonstradas tanto no plasma como nos músculos esquelético e cardíaco de ratos e pacientes com IC. Esses mediadores inflamatórios podem, além de contribuir para a fisiopatologia e progressão da IC, influenciar diretamente no aparecimento das manifestações clínicas da síndrome da IC, principalmente nas alterações relacionadas à diminuição e ao funcionamento da massa muscular<sup>8,9</sup>.

Por conseguinte, apesar de, nos últimos anos, a grande maioria dos estudos sobre IC ter se concentrado nas citocinas pró-inflamatórias, atualmente as citocinas anti-inflamatórias, em especial a IL-10, têm ganhado destaque e podem ter um papel importante na fisiopatologia da IC<sup>10,11</sup>. Em pacientes com IC e, principalmente, nos casos de disfunção ventricular esquerda, uma diminuição na concentração plasmática de IL-10 tem sido relatada e correlacionada positivamente com uma piora na fração de ejeção do ventrículo esquerdo<sup>12</sup>. Além disso, em animais com IC pós-IM, a utilização da relação da produção da IL-10 e do TNF- $\alpha$  (razão IL-10/TNF- $\alpha$ ) tem sido recentemente demonstrada como um indicador que se relaciona com maior precisão com o grau de disfunção ventricular<sup>12</sup>.

De fato, nos modelos animais e em pacientes com IC, a distribuição de fibras musculares esqueléticas em tipo I (aeróbias), tipo IIa (aeróbias e anaeróbias) e tipo IIb (anaeróbias) apresenta alterações na sua composição. Notadamente, as fibras musculares esqueléticas do tipo I são as mais afetadas, pois desenvolvem algumas características similares às do tipo IIa<sup>13</sup>, além da redução da densidade capilar<sup>3</sup> e diminuição da atividade máxima da enzima citocromo C oxidase<sup>9</sup>, quando comparado ao mesmo tipo de fibra muscular em indivíduos sem alterações patológicas no músculo esquelético. Da mesma forma, estudos realizados em ratos com disfunção ventricular pós-IM têm reproduzido essas mesmas alterações<sup>14</sup>, demonstrando, dessa forma, que as fibras do tipo I do músculo esquelético parecem ser as mais afetadas nessa condição.

Além disso, essas alterações têm sido correlacionadas ao aumento na expressão dos genes e produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) no músculo quadríceps em humanos<sup>15</sup> e animais<sup>7</sup>. Apesar de as alterações deletérias ocorrerem predominantemente nas fibras do tipo I, estudos recentes têm demonstrado a presença de uma condição inflamatória crônica nesse tecido. Entretanto, até o momento, nenhum estudo avaliou a produção dessas citocinas nos diferentes tipos de fibra muscular, fato que se torna ainda mais relevante ao considerarmos que esse tecido pode ser um importante "fornecedor" sistêmico de citocinas pró-inflamatórias na presença de disfunção ventricular esquerda. Por sua vez, a análise da expressão gênica e a conseqüente produção dessas citocinas podem ser um indicador mais preciso e/ou adicional para uma avaliação da presença de marcadores inflamatórios alterados cronicamente na disfunção ventricular.

Dado o exposto, propomo-nos a estudar a relação dos níveis de citocinas pró-TNF- $\alpha$  e anti-inflamatória (IL-10) no músculo esquelético em um modelo experimental em ratos com disfunção ventricular pós-IM. Ainda, utilizamos o músculo sóleo (fibra do tipo I, predominantemente) e o extensor digital longo (EDL) (fibra do tipo IIb, predominantemente) para comparar o perfil dessas citocinas em diferentes tipos musculares.

## Métodos

### Animais

Os procedimentos experimentais estão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea), tendo sido o protocolo para o uso de animais em experimentação (009/2005) aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (Ceea) em reunião realizada em 17 de fevereiro de 2005.

Utilizaram-se ratos Wistar machos, com idade de 8 semanas. Durante o período experimental, foram mantidos em gaiolas coletivas para 5 ratos em biotério com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com início do período claro às 7 horas, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. A temperatura ambiente da sala foi mantida em  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . A umidade do ar foi mantida em  $60 \pm 5\%$ . A todos os grupos, ofereceu-se ração comercial balanceada (Nuvilab<sup>®</sup> CR1 – Nutrivital Nutrientes Ltda.) e água *ad libitum*. A fim de minimizar a influência aguda do *status* prandial nos resultados experimentais, todos os animais foram submetidos a jejum durante a noite anterior à manhã do sacrifício.

### Indução do infarto agudo do miocárdio (IM) através da lesão miocárdica por isquemia sem reperfusão

Esse procedimento cirúrgico foi realizado por meio das técnicas do laboratório de fisiologia celular e do exercício (KCM ou MAC). Os animais foram submetidos à anestesia com uma solução de Ketalar<sup>®</sup> (80 mg/kg) + Rompun<sup>®</sup> (12 mg/kg). Depois da intubação orotraqueal, o animal era submetido à ventilação mecânica com ventilador Harvard, modelo 683

(frequência de 90 m/min e volume corrente de 2,0 ml). Após tricotomia, realizava-se toracotomia no hemitórax esquerdo, no espaço intercostal do *ictus cordis*, e o coração era rapidamente exteriorizado. O ramo interventricular anterior da artéria coronária esquerda era identificado e ligado entre as bordas do apêndice auricular esquerdo e o tronco da artéria pulmonar com fio Prolene 6-0. Promovia-se hiperinsuflação pulmonar, e a parede torácica era fechada por sutura em bolsa previamente realizada. Para a operação Sham, utilizou-se o mesmo procedimento cirúrgico, porém sem o rompimento do pericárdio e a ligação da artéria coronária descendente anterior esquerda.

Promovida a ligadura coronariana, os animais eram mantidos no biotério por mais 3 semanas. A partir da quarta semana, realizava-se o ecodopplercardiograma (ECO) para confirmação da presença do infarto, avaliação do tamanho deste e realização de medidas ecocardiográficas, incluindo fração de ejeção do ventrículo esquerdo.

### Ecocardiograma Doppler transtorácico

Durante 4 e 12 semanas após o IM, os animais foram submetidos à anestesia com uma solução de Ketalar® (50 mg/kg) + Rompun® (10 mg/kg) por via intraperitoneal para o ecocardiograma.

O ecocardiograma foi realizado com aparelho HP Sonos 5500 (Hewlett Packard, Andover, MA, USA) utilizando transdutor de frequência fundamental de 12 MHz, com as imagens obtidas com profundidade de 2 cm. Após anestesia e usando o mesmo esquema anterior, os animais eram posicionados em decúbito lateral esquerdo, e colocavam-se três eletrodos nas patas para obtenção do eletrocardiograma.

As imagens em cortes transversais do ventrículo esquerdo eram gravadas em fitas de vídeo para posterior análise. Foram utilizadas as janelas paraesternal esquerda (corte longitudinal e transversal) e apical (quatro e duas câmaras). As medidas lineares, realizadas nas imagens obtidas pelo modo-M, foram: diâmetros do VE ao final da diástole (DDVE) e da sístole (DSVE), o diâmetro anteroposterior do átrio esquerdo (AE) e o diâmetro de parede anterior do ventrículo esquerdo em diástole (Paved). A extensão do infarto (%IM), avaliada pela medida do comprimento das regiões acinética e/ou hipocinética (RAH) das paredes ventriculares, foi expressa como porcentagem do perímetro total do contorno endocárdico (PE) em três cortes transversais do VE (nível das bordas das cúspides da valva mitral, dos músculos papilares e da região apical), segundo padronizações anteriores caracterizadas pelo grupo do professor Paulo J. F. Tucci<sup>16,17</sup>, utilizando a fórmula: IIM (%) = (RAH/PE) x 100.

A função sistólica foi avaliada pela fração de ejeção (FE). Os volumes ventriculares diastólico (Vd) e sistólico (Vs) do VE foram obtidos pelo método de Simpson biplano (apical, quatro e duas câmaras), e calculou-se a FE pela fórmula: FE = (Vd - Vs / Vd) x 100. A função diastólica foi analisada utilizando-se os índices derivados da curva de velocidade do fluxo diastólico mitral obtido pela técnica de Doppler pulsátil. Obteve-se a curva de velocidade do fluxo diastólico a partir da imagem apical de quatro câmaras, posicionando-se a amostragem

de volume próximo à face ventricular da valva mitral. Foram determinadas onda E, onda A e razão E/A. Ao final do estudo por ECO, os animais em que o IM assumia tamanho maior do que 40% do VE foram selecionados para o grupo infarto do miocárdio (IM). Após 12 semanas, os animais do grupo IM foram reavaliados conforme os parâmetros supracitados.

### Desenho experimental

Após a análise ecocardiográfica, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: falso operado (Sham, n = 13) e infarto do miocárdio (IM, n = 17). Os animais Sham foram submetidos a todos os procedimentos cirúrgicos, com exceção da ligadura da artéria coronária. Após esse período, os animais foram mantidos durante 8 semanas para observação. Depois desse período, os animais foram sacrificados por decapitação sem anestesia.

### Obtenção e homogeneização dos tecidos

Imediatamente após o sacrifício, os tecidos e órgãos (fígado, pulmões, coração, músculo sóleo e extensor digital longo - EDL) foram removidos, pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para dosagens posteriores.

### Quantificação das citocinas teciduais

Para dosagem das citocinas TNF- $\alpha$  (DY510) e IL-10 (DY522), utilizou-se o método *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (DuoSet ELISA) de captura (R&D System, Inc., Minneapolis, USA). Esse ensaio foi realizado em amostras homogeneizadas, provenientes dos diferentes grupos experimentais, de acordo com as normas descritas pelo fabricante. Os resultados estão expressos em pg por  $\mu$ g de proteínas totais nos tecidos avaliados de acordo com o método colorimétrico descrito por Bradford<sup>18</sup>.

### Quantificação da expressão dos genes das citocinas teciduais

Para isolar o RNA total do músculo sóleo e EDL (pata posterior direita), as amostras pesando entre 0,2 e 0,5 g foram homogeneizadas em TRIZOL<sup>®</sup> Reagent, de acordo com as normas descritas pelo fabricante<sup>19</sup>. As amostras de RNA foram transcritas para DNA em um termociclador (Techne, Cambridge, UK). Para a síntese do cDNA, utilizaram-se 2  $\mu$ g de RNA total de cada amostra. As amostras foram incubadas com 0,5  $\mu$ g/ml de oligo dT12-18 (Invitrogen, USA) a 65°C por 5 minutos, para se obter a primeira fita de cDNA.

Os *primers* foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies (Prodinol Biotecnologia S/A). A sequência foi determinada usando o *software Primer 3*, disponível no site <http://www.genome.wi.mit.edu>. Selecionaram-se os *primers* sempre de acordo com os seguintes parâmetros descritos por Marone e cols.<sup>20</sup>: TNF- $\alpha$  (NM 012675.2), *sense*: 5' TCT CAA AAC TCG AGT GAC AAG C 3', *anti-sense*: 5' GGT TGT CTT TGA GAT CCA TGC 3'; IL-10 (NM 012854.1), *sense*: 5' GAG AGA AGC TGA AGA CCC TCT G 3', *anti-sense*: 5' TCA TTC ATG GCC TTG TAG ACA C 3'; e 18S (NM 012135.1), *sense*: 5' ACCAGTTCGCCATGGATGA 3', *anti-sense*: 5' TGCCCGAGCCGTTGTC 3'.

A expressão dos genes foi quantificada por PCR em tempo real por Higuchi e cols.<sup>21</sup>, utilizando os aparelhos 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA) e Syber green como marcadores de fluorescência (n°11744-500, Invitrogen, USA). As reações foram realizadas em 25  $\mu$ l de uma mistura contendo 1  $\mu$ l do cDNA da amostra, 0,5  $\mu$ l dos primers (ajustados de acordo com a concentração apresentada a seguir), 10,5  $\mu$ l de água Depec e 12,5  $\mu$ l do mix Syber green master (dNTP – Tampão de reação, Taq DNA polimerase Syber green I). As condições do PCR em tempo real foram: primeiro ciclo (único) a 95°C por 15 minutos para ativação da enzima e 40 ciclos com fases de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento a 60°C por 30 segundos. Utilizou-se a sequência de primers de acordo com as seguintes concentrações:

- Músculo sóleo: TNF- $\alpha$  e IL-10 (200 nM) e 18S (300 nM).
- EDL - TNF- $\alpha$ : IL-10 (200 nM) e 18S (200 nM).

### Análise estatística

A análise dos dados foi realizada por meio do software SigmaStat (versão 3.1, SigmaStat, Systat, Point Richmond,

CA). A média aritmética e o erro padrão da média (EPM) foram calculados para todas as variáveis estudadas. Após o período experimental, os valores das diferentes análises entre os resultados foram realizados por teste t-Student não pareado. O nível de significância utilizado em todas as análises foi inferior a 5%, ou seja,  $p < 0,05$ .

## Resultados

### Características gerais dos grupos experimentais

A mortalidade pós-operatória foi de 23,8% ( $n = 5$ , animais que evoluíram ao óbito durante as 24 horas após o procedimento cirúrgico) no grupo IM e de 13,3% ( $n = 2$ ) no grupo Sham. O peso corporal total dos pulmões, do fígado, dos músculos sóleo e EDL, em valor absoluto, não foi diferentes em nenhum dos grupos avaliados (Tabela 1). O grupo IM apresentou aumento no peso absoluto do coração de 23,8% ( $p < 0,012$ ) quando comparado aos animais do grupo Sham. Os animais submetidos ao IM demonstraram aumento na relação peso úmido/peso seco dos pulmões (4,7%,  $p < 0,011$ ), no fígado (3,8,  $p < 0,035$ ), bem como diminuição no peso do músculo sóleo relativo ao peso corporal em 27,7% ( $p < 0,002$ ) (Tabela 2).

**Tabela 1 – Peso corporal total e tecidual total em ratos que foram submetidos à operação Sham e à operação com infarto agudo do miocárdio produzido pela ligação da artéria coronária após 12 semanas**

Peso Absoluto (g)	Sham (13)	IM (17)
Corporal	319,3 $\pm$ 17,9	346,2 $\pm$ 20,1
Coração	0,90 $\pm$ 0,02	1,12 $\pm$ 0,06
Fígado	7,66 $\pm$ 0,50	7,52 $\pm$ 0,79
Pulmão	4,22 $\pm$ 0,08	4,41 $\pm$ 0,14
Sóleo	0,136 $\pm$ 0,01	0,132 $\pm$ 0,01
EDL	0,150 $\pm$ 0,01	0,144 $\pm$ 0,01

Observação: Os resultados estão expressos em gramas e representam média  $\pm$  EPM de 30 animais. \*Diferença significativa com o grupo Sham,  $p < 0,05$  (teste t-Student).

**Tabela 2 – Peso tecidual total relativo em ratos que foram submetidos à operação Sham e à operação com infarto agudo do miocárdio produzido pela ligação da artéria coronária após 12 semanas**

Peso Relativo	Sham (13)	IM (17)
Coração (mg/g)	2,99 $\pm$ 0,16	3,24 $\pm$ 0,16
Fígado (sec. x umi.)	3,04 $\pm$ 0,03	3,15 $\pm$ 0,03*
Pulmão (sec. x umi.)	4,22 $\pm$ 0,08	4,41 $\pm$ 0,14*
Sóleo (mg/g)	0,44 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,02*
EDL (mg/g)	0,42 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,01

Observação: Os resultados estão expressos em valores relativos ao peso corporal total, peso úmido (umi.) pelo peso seco (sec.) e representam média  $\pm$  EPM de 30 animais. \*Diferença significativa com o grupo Sham,  $p < 0,05$  (teste t-Student).

### Função do ventrículo esquerdo em animais submetidos ao IM

Nos 17 animais com IM, observaram-se alterações contráteis segmentares do ventrículo em estudo anatomopatológico, após 4 semanas do procedimento cirúrgico (Tabela 3). Nenhum animal do grupo Sham apresentou alteração ecocardiográfica do ventrículo esquerdo sugestiva de IM. As frações de ejeção (FE) e de encurtamento (FS) sistólicas apresentaram redução em 40,1% e 55,7% ( $p < 0,001$ ), respectivamente, quando esse resultado foi comparado com o obtido pelo grupo Sham. O volume diastólico final (VDF) apresentou aumento de 82,2% ( $p < 0,01$ ), quando comparado ao obtido pelo grupo Sham. Os animais do grupo IM apresentaram uma área de infarto de 39  $\pm$  0,05%.

### Níveis de TNF- $\alpha$ no músculo estriado esquelético

O grupo de animais submetidos ao IM apresentou aumento significativo de 26,5% ( $p < 0,05$ ) na produção de TNF- $\alpha$  no

**Tabela 3 – Valores das variáveis funcionais do ventrículo esquerdo ao ecocardiograma Doppler após o período de 4 semanas em ratos que foram submetidos à operação Sham e à operação com infarto agudo do miocárdio produzido pela ligação da artéria coronária (IM)**

Parâmetros	Sham (13)	IM (17)
FE (%)	67,4 $\pm$ 0,10	40,4 $\pm$ 0,06*
FS (mm/s)	43,0 $\pm$ 3,0	19,5 $\pm$ 6,5*
PAVED (mm)	7,73 $\pm$ 0,32	10,06 $\pm$ 0,77*
VDF (ml)	1,69 $\pm$ 0,32	3,08 $\pm$ 1,48*
IM (%)		39 $\pm$ 0,05

FE - fração de ejeção, FS - fração de encurtamento, Paved - parede anterior do ventrículo esquerdo em diástole, VDF - volume diastólico final e IM - índice do infarto do miocárdio. Os resultados representam média  $\pm$  EPM de 30 animais. \*Diferença significativa com o grupo Sham,  $p < 0,05$  (teste t-Student).

músculo sóleo, quando comparado ao grupo Sham (Figura 1). No músculo EDL, os níveis de TNF- $\alpha$  não foram detectados. Os animais do grupo IM (Figura 2A) apresentaram aumento significativo, em 3 vezes ( $p < 0,01$ ), na expressão gênica de TNF- $\alpha$  no músculo sóleo, sem alteração no músculo EDL (Figura 2B).

### Níveis de IL-10 no músculo estriado esquelético

O grupo de animais submetidos ao IM apresentou diminuição significativa de 38,2% ( $p < 0,05$ ) na produção de IL-10 no músculo sóleo, quando comparado ao grupo Sham-S (Figura 1). No músculo EDL, não houve alteração nos níveis dessa citocina. Os animais do grupo IM (Figura 2A) apresentaram aumento significativo em 3,6 vezes ( $p < 0,05$ ) na expressão do gene IL-10 no músculo sóleo, sem alteração no músculo EDL (Figura 2B).

### Razão dos níveis de IL-10/TNF- $\alpha$ no músculo estriado esquelético

O grupo de animais submetidos ao IM apresentou diminuição significativa na razão IL-10/TNF- $\alpha$  de 36,5% ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao grupo Sham. Na figura 3B, os dados demonstram a participação de cada uma das citocinas na razão IL-10/TNF- $\alpha$ .

## Discussão

No presente estudo, a concentração da citocina pró-inflamatória (TNF- $\alpha$ ), bem como sua expressão gênica no músculo sóleo, apresentou-se aumentada em animais com disfunção ventricular pós-IM. Tal fato foi evidenciado apenas nesse músculo, sem alteração detectada no músculo EDL. Além disso, essas alterações foram acompanhadas por uma redução na concentração da citocina anti-inflamatória (IL-10), também evidenciada apenas no músculo sóleo, e, por sua vez, a razão IL-10/TNF- $\alpha$  apresentou-se alterada, sugerindo o predomínio do TNF- $\alpha$  em detrimento da IL-10 nesse tecido.

A cirurgia de ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda tem sido utilizada como modelo experimental de IM em animais, por meio da indução da isquemia do miocárdio, com ou sem reperfusão<sup>7,22,23</sup>. Entretanto, dados a respeito da função do ventrículo esquerdo são insuficientes para a caracterização clínica de IC, uma vez que essa síndrome é definida pela presença de anormalidades hemodinâmicas, retenção hídrica (congestão) e intolerância ao exercício físico<sup>24,25</sup>. Assim, mesmo nosso estudo apresentando dados sobre o quadro congestivo, tais como a razão do peso seco pelo peso úmido do fígado e pulmão, o que nos sugere a presença de edema pulmonar e congestão hepática, optamos por classificar o grupo IM como animais com disfunção ventricular pós-IM e não com IC. É possível que a maioria dos animais do grupo IM tenha também alterações clínicas de IC, mas isso não foi estudado no presente trabalho.

Inicialmente, postulou-se que a produção de TNF- $\alpha$  era exclusivamente executada por monócitos e macrófagos quando estimulados adequadamente<sup>26</sup>. Recentemente, a expressão gênica e proteica de TNF- $\alpha$  no músculo esquelético foi caracterizada em humanos<sup>27</sup>, em um estudo que

demonstrou, pela primeira vez, a presença dessa citocina na ausência de monócitos infiltrados ou macrófagos. Isso indicou que a própria fibra muscular esquelética pode produzi-la, e assim esta poderia atuar de maneira autócrina e parácrina,

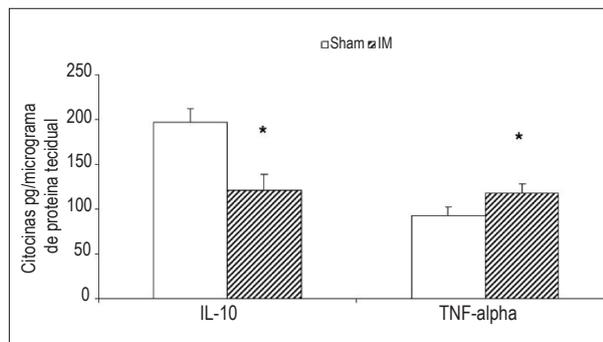


Fig. 1 – Quantificação do IL-10 e TNF- $\alpha$  no músculo sóleo em ratos que foram submetidos à operação Sham e à operação com infarto agudo do miocárdio produzido pela ligação da artéria coronária após 12 semanas. O conteúdo de citocinas foi analisado por ELISA e normalizado pelo conteúdo proteico total dos tecidos avaliados. Os resultados representam média  $\pm$  EPM de 14 animais. \*Diferença significativa com o grupo Sham,  $p < 0,05$  (teste t-Student).

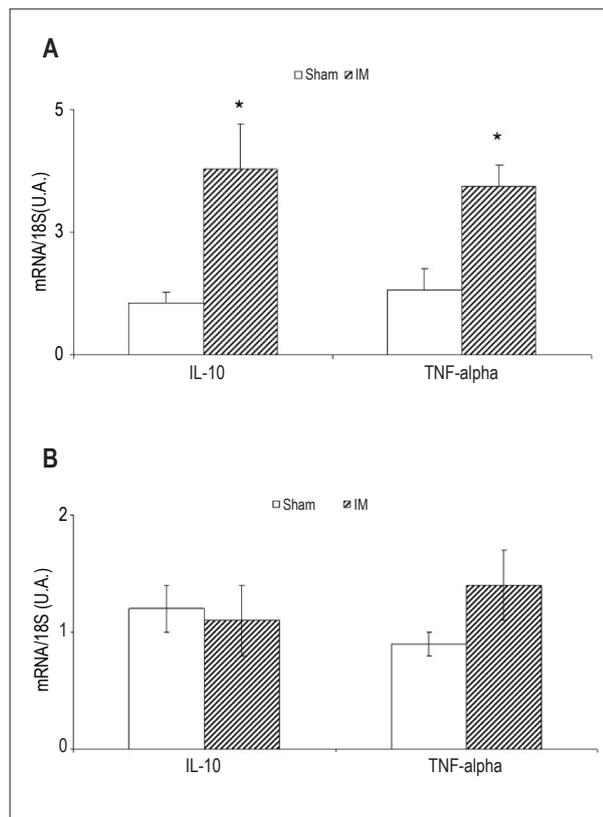
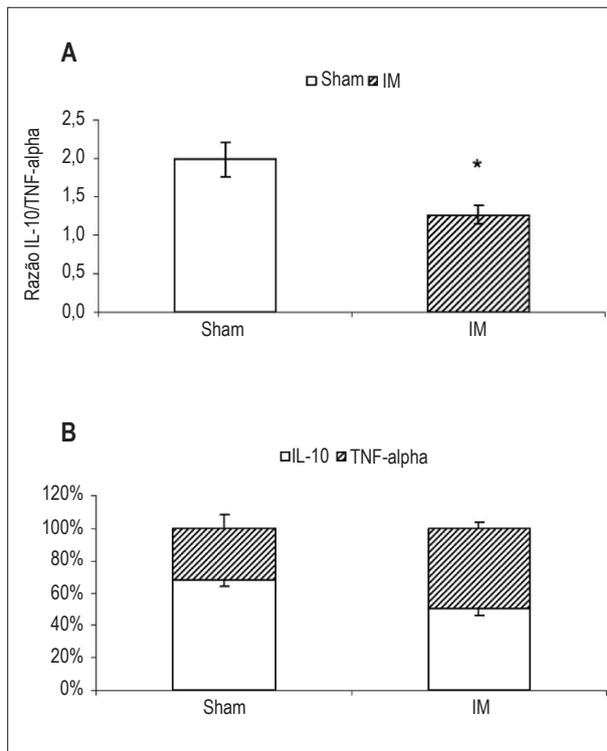


Fig. 2 – Expressão dos genes IL-10 e TNF- $\alpha$  no músculo sóleo (A) e EDL (B) em ratos que foram submetidos à operação Sham e à operação com infarto agudo do miocárdio produzido pela ligação da artéria coronária após 12 semanas. A expressão do mRNA foi analisada por PCR em tempo real. Os resultados representam média  $\pm$  EPM, em duplicatas de 14 animais. \*Diferença significativa com o grupo Sham,  $p < 0,05$  (teste t-Student).



**Fig. 3** – Razão dos níveis (A) e perfil dos níveis de citocinas na razão (B) de IL-10/TNF- $\alpha$  no músculo. O conteúdo de citocinas foi analisado por ELISA e normalizado pelo conteúdo proteico total dos tecidos avaliados. A proporção é relativa à porcentagem de cada citocina na razão. Os resultados representam média  $\pm$  EPM de 14 animais. \*Diferença significativa com o grupo Sham,  $p < 0,05$  (teste t-Student).

em quantidade suficiente para mediar uma série de alterações morfológicas e funcionais no tecido<sup>3,28</sup>.

Em nosso estudo, ratos com disfunção ventricular pós-IM apresentaram um aumento no conteúdo da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  que foi apenas evidente no músculo sóleo, sem alteração no músculo EDL (não foi detectado pelo ELISA). Essa mesma condição foi evidenciada pelo aumento na expressão gênica do TNF- $\alpha$ , sugerindo que o aumento do conteúdo proteico de TNF- $\alpha$  pode ter sido resultante do aumento dos níveis de mRNA. Esse resultado está de acordo com outro estudo<sup>7</sup> que utilizou o mesmo modelo experimental e demonstrou aumento tanto na expressão gênica como nos níveis musculares do TNF- $\alpha$ . Porém, esses parâmetros foram avaliados no músculo quadríceps (misto com relação à composição tipo de fibra muscular).

Dessa forma, apesar de o aumento de mediadores inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) no músculo esquelético ser bem caracterizado tanto em pacientes com IC<sup>15</sup> como em ratos com IC e disfunção ventricular esquerda pós-IM<sup>7</sup>, ambas as análises foram realizadas no músculo quadríceps, e pouco se sabe sobre qual é o tipo de fibra muscular mais afetado na IC. Isso se torna ainda mais evidente quando se leva em consideração que, além de essas alterações degenerativas no músculo esquelético terem sido relacionadas à presença desses marcadores, a maioria dos estudos também tem demonstrado que o a fibra mais afetada, em

termos morfológicos e funcionais na IC, é do tipo I<sup>3</sup>. Assim, mostramos, pela primeira vez, que essa condição parece ser específica ao tecido muscular com o predomínio de fibras do tipo I. Como não separamos o total do homogenato em fração solúvel e ligada à membrana celular, não podemos inferir que a proteína avaliada foi aquela produzida exclusivamente pelo tecido avaliado.

Níveis plasmáticos dessas citocinas em pacientes com IC têm sido relacionados tanto com o prognóstico como com a severidade dessa doença, fato que tem sido demonstrado ser ainda mais evidente em pacientes com IC mais avançada (classe funcional IV, NYHA)<sup>6,29</sup>. Dessa forma, esse aumento tem sido apontado como resultante de um quadro inflamatório periférico, o qual seria idealmente desencadeado no músculo esquelético, por causa do fluxo sanguíneo reduzido e consequente aumento de espécies reativas do oxigênio<sup>5</sup>. Essa hipótese vem ganhando consistência, uma vez que os estudos, tanto em animais<sup>7,12,23,30,31</sup> como em humanos<sup>2,32,33</sup>, demonstraram que o aumento no *milieu* inflamatório local ocorre independentemente das alterações nos níveis plasmáticos, principalmente em pacientes em classes funcionais II e III (NYHA). Por conseguinte, o aumento da expressão gênica e proteica dessas citocinas, mesmo sem alterações nos níveis plasmáticos, confirma os resultados obtidos por estudos que propõem que a inflamação local precede o aumento plasmático e pode ser um indicador mais preciso no que diz respeito à progressão da IC.

Os efeitos da IL-10, *in vivo*, têm sido observados em modelos de inflamação, autoimunidade, tolerância e infecções por parasitas, todos em animais<sup>34</sup>. A IL-10 atenua, em camundongos, os efeitos deletérios induzidos por lipopolissacarídeo (LPS) e SEB (enterotoxina estafilococos B). Além disso, esses efeitos estão correlacionados à diminuição dos níveis circulantes de TNF- $\alpha$ . Em macrófagos cultivados com LPS, além da produção aumentada das citocinas pró-inflamatórias, essa condição é seguida do aumento na IL-10 e tem o TNF- $\alpha$  como importante indutor da expressão gênica e produção da IL-10<sup>34,35</sup>. Dessa forma, a IL-10 é a principal citocina anti-inflamatória e tem um papel importante em modular a produção de TNF- $\alpha$ .

Em ratos com disfunção ventricular pós-IM, os níveis teciduais de IL-10 foram reduzidos apenas no músculo sóleo. Nesses animais, a expressão gênica apresentou-se aumentada no mesmo tecido, demonstrando que a diminuição em sua produção pode não estar relacionada, pelo menos neste aspecto, às alterações expressão do mRNA. Isso sugere que o efeito desse modelo experimental na concentração de IL-10 pode ter sido mediado em um nível pós-transcricional, como a produção de IL-10 por elementos regulatórios transcricionais, como os *enhancers* e/ou mecanismos de controle pós-transcricional. A última possibilidade é descrita em clones de células T, as quais expressam a IL-10 sem alterações detectada nos níveis de mRNA<sup>36</sup>. Assim, uma combinação de mecanismos pós-transcricional e ubiquitinação para a expressão da IL-10 pode ter um papel crucial para essa citocina<sup>37</sup>. Além disso, apesar de o TNF- $\alpha$  ser capaz de induzir a expressão gênica da IL-10<sup>34</sup> e, consequentemente, a expressão da proteína, esse efeito parece ser dependente

da intensidade da condição inflamatória, e, dessa forma, esse aumento na expressão gênica da IL-10 poderia ter ocorrido por causa de uma diminuição na produção da proteína (relação mRNA/proteína), em direção ao restabelecimento de uma condição de equilíbrio.

Por conseguinte, o que apresentamos de novo é o fato de ter havido aumento não só na expressão gênica, mas também no conteúdo da proteína, no caso da TNF- $\alpha$ , e uma diminuição da proteína IL-10, sugerindo, nesta condição, o direcionamento ao desequilíbrio na produção delas. Essa condição pode tender ao predomínio de um *milieu* pró-inflamatório em detrimento do anti-inflamatório, notadamente através da produção aumentada de TNF- $\alpha$  e IL-10 diminuída. Essa mesma relação foi observada por Stumpf e cols.<sup>10</sup> que utilizaram a razão IL-10/TNF- $\alpha$  para caracterizar o “balanço” pró/ anti-inflamatório. Nesse estudo, paciente com IC (classe funcional NYHA III/IV) apresentaram níveis aumentados de TNF- $\alpha$  e diminuídos de IL-10, quando comparado a indivíduos controle (sem IC) da mesma faixa etária.

Apesar de os mecanismos moleculares não estarem bem caracterizados, estudos que utilizaram a IL-10 como terapêutica (rhIL-10, em humanos), assim como em camundongos nocautes (IL-10<sup>-/-</sup>), evidenciaram a importância dessa citocina em reverter as alterações provenientes da inflamação local, notadamente as mediadas pelo TNF- $\alpha$ <sup>10</sup>. Esse resultado vai ao encontro do nosso, uma vez que a razão IL-10/ TNF- $\alpha$  diminuiu por causa de um aumento do TNF- $\alpha$  e, principalmente, pela diminuição da IL-10, o que sugere um importante papel da IL-10 no “controle” inflamatório local no músculo sóleo.

Em pacientes com IC, a perda ou atrofia de massa muscular começa nos estágios precoces do desenvolvimento do quadro de IC<sup>8</sup>, relacionados mais às alterações intrínsecas no músculo esquelético<sup>3,38</sup> do que às provenientes da inatividade física (fator mais determinante em mulheres). Recentemente, tem sido demonstrado que, nessa condição, ocorre uma ativação imune, notadamente por meio de mediadores inflamatórios, que pode contribuir para o desenvolvimento desse quadro<sup>3,7,8,39</sup>. Em ratos com IC e disfunção ventricular esquerda pós-IM, essa condição tem sido reproduzida tanto pela diminuição na área de secção transversa como pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (músculo quadríceps)<sup>7</sup>, da mesma maneira que nosso estudo demonstrou uma redução do peso relativo ao peso corporal no músculo esquelético, condição que se mostrou dependente do tipo de fibra muscular predominante, uma vez que essa condição somente esteve presente no músculo sóleo,

sem alteração no músculo EDL. Essas alterações afetam direta e indiretamente o músculo esquelético, e estudos recentes<sup>13,14</sup>, realizados em ratos com IC e disfunção ventricular esquerda pós-IM, demonstraram que o tecido muscular – quando comparado aos tecidos em que predominam as fibras do tipo IIa e IIb (por exemplo, EDL) – em que predominam as fibras do tipo I (por exemplo, sóleo) apresenta uma sensibilidade maior às alterações, que são características desse modelo experimental e que comprometem o aporte sanguíneo e de oxigênio. Por conseguinte, as alterações avaliadas nas citocinas pró e anti-inflamatórias demonstraram a presença de um estado inflamatório crônico no músculo sóleo, avaliada pela relação IL-10/TNF- $\alpha$ , a qual foi paralela a uma redução na massa do muscular, condição apenas evidenciada no músculo com predominância de fibras do tipo I (sóleo).

Vale destacar ainda que, diferentemente dos modelos supracitados, nossos animais ainda não apresentavam manifestações clínicas claras de IC, sugerindo que, mesmo antes do estabelecimento dessa síndrome, alterações no músculo esquelético já são evidentes em animais com disfunção ventricular esquerda, e, dessa forma, o músculo sóleo pode ser um sítio de produção de mediadores inflamatórios nessa condição.

Em resumo, nossos resultados sugerem um papel de destaque da razão IL-10/ TNF- $\alpha$ , que pode ter um papel aditivo na avaliação da deterioração e progressão do quadro da IC, uma vez que parece estar presente antes do estabelecimento da síndrome clínica da IC. No entanto, mais estudos são necessários para compreensão dos mecanismos moleculares que modulam os eventos supracitados.

### Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

### Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado por Fapesp nº 05/01445-0 de Marília C. L. Seelaender e 07/52782-1 de Miguel Luiz Batista Júnior.

### Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de doutorado de Miguel Luiz Batista Júnior pelo Departamento de Biologia Celular e de Desenvolvimento do TCBI/USP.

## Referências

1. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Revisão das II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o diagnóstico e tratamento da insuficiência cardíaca. Arq Bras Cardiol. 2002; 79: 1-30.
2. Aukrust P, Ueland T, Lien E, Bendtzen K, Müller F, Andreassen AK, et al. Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. Am J Cardiol. 1999; 83 (3): 376-82.
3. Larsen AI, Lindal S, Aukrust P, Tøft I, Aarsland T, Dickstein K. Effect of exercise training on skeletal muscle fibre characteristics in men with chronic heart

failure: correlation between skeletal muscle alterations, cytokines and exercise capacity. Int J Cardiol. 2002; 83 (1): 25-32.

4. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Franca GS, Ganiats TG, et al. ACC/AHA 2005 Guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): Developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung

- Transplantation: Endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation*. 2005; 112 (12): e154-235.
5. Coats A, Clark A, Piepoli M, Volterrani M, Poole-Wilson P. Symptoms and quality of life in heart failure: the muscle hypothesis. *Br Heart J*. 1994; 72: S36-9.
  6. Anker SD, von Haehling S. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart*. 2004; 90 (4): 464-70.
  7. Schulze P, Gielen S, Adams V, Linke A, Mobius-Winkler S, Erbs S, et al. Muscular levels of proinflammatory cytokines correlate with a reduced expression of insulinlike growth factor-1 in chronic heart failure. *Basic Res Cardiol*. 2003; 98 (4): 267-74.
  8. Toth MJ, Ades PA, Tischler MD, Tracy RP, LeWinter MM. Immune activation is associated with reduced skeletal muscle mass and physical function in chronic heart failure. *Int J Cardiol*. 2006; 109 (2): 179-87.
  9. Gielen S, Adams V, Linke A, Erbs S, Mobius-Winkler S, Schubert A, et al. Exercise training in chronic heart failure: correlation between reduced local inflammation and improved oxidative capacity in the skeletal muscle. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2005; 12 (4): 393-400.
  10. Stumpf C, Lehner C, Yilmaz A, Daniel WG, Garlachs CD. Decrease of serum levels of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in patients with advanced chronic heart failure. *Clin Sci*. 2003; 105 (1): 45-50.
  11. Yamaoka M, Yamaguchi S, Okuyama M, Tomoike H. Anti-inflammatory cytokine profile in human heart failure: behavior of interleukin-10 in association with tumor necrosis factor-alpha. *Jpn Circ J*. 1999; 63 (12): 951-6.
  12. Kaur K, Sharma A, Singal P. Significance of changes in TNF- $\alpha$  and IL-10 levels in the progression of heart failure subsequent to myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 291 (1): H106-13.
  13. Richardson TE, Kindig CA, Musch TI, Poole DC. Effects of chronic heart failure on skeletal muscle capillary hemodynamics at rest and during contractions. *J Appl Physiol*. 2003; 95 (3): 1055-62.
  14. Behnke BJ, Delp MD, McDonough P, Spier SA, Poole DC, Musch TI. Effects of chronic heart failure on microvascular oxygen exchange dynamics in muscles of contrasting fiber type. *Cardiovasc Res*. 2004; 61 (2): 325-32.
  15. Gielen S, Adams V, Mobius-Winkler S, Linke A, Erbs S, Yu J, et al. Anti-inflammatory effects of exercise training in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 42 (5): 861-8.
  16. Nozawa E, Kanashiro RM, Murad N, Carvalho AC, Cravo SL, Tucci PJ, et al. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2006; 39: 687-95.
  17. Kanashiro R, Saraiva R, Alberta A, Antonio E, Moisés V, Tucci P. Immediate functional effects of left ventricular reduction: a doppler echocardiographic study in the rat. *J Card Fail*. 2006; 12 (2): 163-9.
  18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-54.
  19. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162 (1): 156-9.
  20. Marone M, Mozzetti S, De Ritis D, Pierelli L, Scambia G. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biol Proced Online*. 2001; 3: 19-25.
  21. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences; *Biotechnology* (NY). 1992; 10 (4): 413-7.
  22. Bregagnollo EA, Okoshi K, Matsubara BB, Tucci PJ. End-systolic pressure-diameter relation of the left ventricle during transient and sustained elevations of blood pressure. *Arq Bras Cardiol*. 2000; 75: 26-32.
  23. Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation*. 1998; 98 (2): 149-56.
  24. Hill M, Singal P. Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction. *Circulation*. 1997; 96 (7): 2414-20.
  25. Armstrong PW, Moe GW. Medical advances in the treatment of congestive heart failure. *Circulation*. 1993; 88 (6): 2941-52.
  26. Beyaert R, Fiers W. Tumor necrosis factor and lymphotoxin. In: Mire-Sluis A, Thorpe R (eds). *Cytokines*. 2<sup>nd</sup> ed. California: Academic Press; 1999. p. 335-45.
  27. Saghizadeh M, Ong J, Garvey W, Henry R, Kern P. The expression of TNF alpha by human muscle: relationship to insulin resistance. *J Clin Invest*. 1996; 97 (4): 1111-6.
  28. Spate U, Schulze PC. Proinflammatory cytokines and skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004; 7: 265-9.
  29. Anker SD, Coats AJS. Cardiac cachexia: a syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. *Chest*. 1999; 115 (3): 836-47.
  30. Batista ML Jr, Santos RV, Cunha LM. Changes in the pro-inflammatory cytokine production and peritoneal macrophage function in rats with chronic heart failure. *Cytokine*. 2006; 34 (5-6): 284-90.
  31. Batista ML Jr, Santos RVT, Oliveira EM, Seelaender MC, Costa Rosa LF. Endurance training restores peritoneal macrophage function in post-MI congestive heart failure rats. *J Appl Physiol*. 2007; 102 (5): 2033-9.
  32. Yndestad A, Kristian Damås J, Øie E, Ueland T, Gullestad L, Aukrust P. Systemic inflammation in heart failure – The whys and wherefores. *Heart Fail Rev*. 2006; 11 (1): 83-92.
  33. Paulus WJ. How are cytokines activated in heart failure? *Eur J Heart Fail*. 1999; 1 (4): 309-12.
  34. Malefyt R. Interleukin-10. In: Mire-Sluis A, Thorpe R (eds.). *Cytokines*. 2<sup>nd</sup> ed. California: Academic Press; 1999. p. 151-61.
  35. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19 (1): 683-765.
  36. Naora H, Altin JG, Young IG. TCR-dependent and -independent signaling mechanisms differentially regulate lymphokine gene expression in the murine T helper clone D10.G4.1. *J Immunol*. 1994; 152 (12): 5691-702.
  37. Powell MJ, Thompson SAJ, Tone Y, Waldmann H, Tone M. Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region. *J Immunol*. 2000; 165 (1): 292-6.
  38. Duscha BD, Annex BH, Green HJ, Pippen AM, Kraus WE. Deconditioning fails to explain peripheral skeletal muscle alterations in men with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39 (7): 1170-4.
  39. Batista ML Jr, Lopes RD, Seelaender MCL, Lopes AC. Anti-inflammatory effect of physical training in heart failure: role of TNF- $\alpha$  and IL-10. *Arq Bras Cardiol*. 2009. [In press].