

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

AVALIAÇÃO DO PERFIL DA CITOCINA IL-12 TECIDUAIS EM
CAMUNDONGOS COM CARDIOPATIA ISQUÊMICA INDUZIDA
PELA CIRURGIA DE LIGADURA DA ARTÉRIA CORONÁRIA
ESQUERDA E TRATADOS COM G-CSF

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA NA UFAM

Bolsista: Rosiely Libertino de Menezes, FAPEAM

MANAUS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

AVALIAÇÃO DO PERFIL DA CITOCINA IL-12 TECIDUAIS EM
CAMUNDONGOS COM CARDIOPATIA ISQUÊMICA INDUZIDA
PELA CIRURGIA DE LIGADURA DA ARTÉRIA CORONÁRIA
ESQUERDA E TRATADOS COM G-CSF

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA NA UFAM

Bolsista: Rosiely Libertino de Menezes, FAPEAM

Orientadora: Prof^a Dr^a Elisa Brosina de Leon

MANAUS

2014

LIMITAÇÕES

Houve perda de amostras que inviabilizaram a continuação do projeto anterior que tinha como objetivo a identificação de marcadores plasmáticos e sua relação com o tamanho da escara cicatricial em camundongos após a cirurgia de indução de infarto do miocárdio, portanto houve a necessidade de alterações quanto ao projeto inicial. O projeto atual tem como objetivo a identificação dos níveis de IL-12 na musculatura esquelética e diafragmática após a cirurgia de indução do infarto do miocárdio. O material utilizado no presente projeto foi colhido da tese de doutorado da Orientadora Prof Dra. Elisa Brosina de Leon e apresenta dados inéditos.

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hematologia do Amazonas – HEMOAM, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Núcleo de Estudo e Pesquisa

RESUMO

A indução experimental de infarto do miocárdio (IM) tem sido o modelo animal de insuficiência cardíaca mais ampla e comumente utilizado em pesquisas experimentais, visto que a reação inflamatória desencadeada pela lesão isquêmica, leva à liberação de citocinas, podendo ser exemplificada pela interleucina-12 (IL-12). Esta interleucina é secretada por células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. A ação da IL-12 é estimular a produção de interferon-gama (IFN- γ) pelos linfócitos T auxiliares – tipo 1 (TH1) e pelas células NK0. O G-CSF tem sido usado como tratamento para a insuficiência cardíaca após lesão isquêmica, porém, pouco é conhecido sobre seus efeitos nos tecidos periféricos. O objetivo deste estudo foi avaliar a concentração de IL-12 no músculo esquelético e diafragma em camundongos, com infarto induzido, associado ou não ao uso de G-CSF. Utilizaram-se camundongos fêmeas BALB/c, com 4-6 semanas de idade. O experimento foi composto pelos seguintes grupos (n=30): Grupo controle; Grupo infarto do miocárdio (IM); Grupo infarto do miocárdio + G-CSF (IM+G-CSF). Realizou-se o teste de esforço físico após 2 dias de adaptação do animal com a esteira rolante, através de teste progressivo escalonado até a exaustão do mesmo. Após 30 dias da indução do infarto, realizou-se o exame ecográfico e após a eutanásia prosseguiu-se a coleta das amostras de tecido muscular esquelético periférico (isquiotibiais) e diafragma. As concentrações da citocina IL-12 foram quantificadas através do método *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* (ELISA) e os dados demonstrados em densidade óptica. Houve aumento significativo no grupo IM da musculatura esquelética em comparação ao grupo controle, e observou-se diminuição da IL-12 no grupo IM+G-CSF quando comparado ao IM. A análise de IL-12 no diafragma apontou um aumento também significativo do grupo IM comparado ao grupo controle, além de demonstrar um aumento da IL-12 no grupo IM+G-CSF quando comparado ao IM. No perímetro de infarto pode-se perceber um aumento significativo no grupo IM quando relacionado ao IM+GCSF. Na velocidade final verificou-se maior rendimento no grupo IM quando comparado ao grupo controle e um breve aumento no grupo IM+G-CSF quando comparado ao grupo IM. Já na distância percorrida nota-se um aumento no grupo IM quando comparado ao controle, porém há um decréscimo do rendimento no grupo IM+G-CSF quando comparado ao grupo IM. Sendo assim, há um aumento e diminuição variável em alguns quesitos e com isso se pode sugerir mais pesquisas e estudos referentes a IL-12 e sua ação pós IM.

Palavras chave: Interleucina 12 (IL-12), Infarto do Miocárdio (IM), Modelo Experimental, Diafragma e Músculo Esquelético.

ABSTRACT

The experimental induction of myocardial infarction (MI) has been the animal model of heart failure and broader commonly used in experimental research, since inflammatory reaction triggered by ischemic injury leads to the release of cytokines, which can be exemplified by interleukin-12 (IL-12). This interleukin is secreted by dendritic cells, macrophages and B lymphocytes. The action of IL-12 is to stimulate the production of interferon-gamma (IFN- γ) by T helper lymphocytes - type 1 (TH1) cells and the NK0. G-CSF has been used as a treatment for heart failure after ischemic injury, but little is known about its effects in peripheral tissues. The aim of this study was to evaluate the concentration of IL-12 in skeletal muscle and diaphragm in mice with induced infarction, with or without the use of G-CSF. We used female mice BALB / c mice, 4-6 weeks of age. The experiment was composed of the following groups (n = 30): control group; Group myocardial infarction (MI); Group myocardial infarction + G-CSF (G-CSF + IM). We carried out the exercise stress test after 2 days of adaptation of the animal to the treadmill by scaled incremental test to exhaustion thereof. 30 days after induction of myocardial infarction, we performed the ultrasound examination and after euthanasia continued to collect samples of peripheral skeletal muscle tissue (hamstring) and diaphragm. The concentrations of IL-12 were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay method (ELISA) and the data shown in optical density. A significant increase in the IM group skeletal muscle compared to the control group, and there was a decrease in IL-12 in IM + G-CSF group compared to IM. The analysis of IL-12 in the diaphragm also pointed to a significant increase in the MI group compared with the control group, besides showing an increase of IL-12 in 12 IM + G-CSF group compared to IM. On the perimeter of infarction can notice a significant increase in the IM group when related to MI + GCSF. In the end there was a higher rate income in IM group compared to the control group and a brief increase in IM + G-CSF group compared to the IM group. Already in the distance noticed an increase in the IM group compared to the control, but there are A decrease of income in IM + G-CSF group compared to the IM group. Thus, there is an increase and decrease in variable some questions and it can suggest more research and studies on IL-12 and post your IM action.

Keywords: Interleukin 12 (IL-12), Myocardial Infarction (MI), Experimental Model, Diaphragm and Skeletal Muscle.

Sumário

1 INTRODUCAO	8
2 DESENVOLVIMENTO	8
3 MÉTODOS	11
3.1 MODELO EXPERIMENTAL.....	11
3.2 ADMINISTRAÇÃO DO G-CSF	11
3.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FUNCIONAL	12
3.4 AVALIACAO ECOCARDIOGRÁFICA	12
3.5 DOSAGEM DE CITOCINAS	13
3.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	14
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5 CONCLUSÃO	20
6 REFERÊNCIAS	20

1. Introdução

No Brasil, as doenças cardiovasculares ainda permanecem como a primeira causa de mortalidade proporcional, responsáveis por 29% dos óbitos em 2010. O infarto do miocárdio (IM) é a segunda causa de morte mais frequente, e no sistema público de saúde a mortalidade hospitalar dos pacientes internados por IM se mantém persistentemente elevada: em média, 16,2%, em 2000, 16,1%, em 2005, e 15,3%, em 2010, para as internações registradas em todo país¹. O IM é uma isquemia resultante da falta de aporte sanguíneo para as artérias coronárias e que pode acarretar na necrose do músculo cardíaco. Origina-se por uma complicação da doença aterosclerótica crônica². Infarto do miocárdio, infarto cerebral e aneurisma aórtico são as maiores consequências dessa doença³.

O aumento da cavidade ventricular esquerda em resposta a agressão, advinda do infarto, frequentemente vem acompanhada de alterações da geometria e queda do desempenho global da câmara, o que se convencionou chamar de remodelação (ou remodelamento). Tal dilatação do VE, após IM, é um importante determinante do prognóstico, aumentando o risco de insuficiência cardíaca e morte súbita⁴. Estudos realizados em animais com infarto experimental demonstraram que a cavidade ventricular pode continuar a aumentar com o tempo, em função, agora, da região nãoinfartada⁵.

2. Desenvolvimento

Fatores de crescimento hematopoéticos tem sido um foco para o tratamento de doenças cardiovasculares, visto que o processo inflamatório criado em relação à lesão isquêmica desencadeia a liberação de citocinas das mais diversas variedades, que

servirão de sinalização para a proliferação e atração das células do sistema imune. Estes fatores de crescimento são citocinas que atuam na formação e regulação de várias atividades funcionais das células hematopoéticas progenitoras e maduras como quimiotaxia, degranulação, ativação e citotoxicidade. Observou-se que algumas citocinas estariam relacionadas com o remodelamento cardíaco pós-infarto e mobilização de células precursoras da medula óssea para a circulação periférica, sendo que as de maior repercussão são: o G-CSF e o CSF⁶. O G-CSF é sintetizado por macrófagos e em pequena escala por monócitos e fibroblastos. Atua principalmente nas células-tronco da medula óssea estimulando sua divisão e diferenciação em polimorfonucleares, principalmente neutrofilicos. Linfócitos T, macrófagos e, em menores quantidades, células endoteliais e fibroblastos produzem G-CSF. Atua em células precursoras de monócitos/macrófagos e de granulócitos, estimulando sua proliferação e diferenciação, promovendo a produção destas células pela medula óssea⁷.

Uma das estratégias mais utilizadas para o estudo das alterações fisiopatológicas decorrentes da oclusão coronariana é o uso do modelo do infarto experimental no rato. Entre outros fatores, esse fato é decorrência da similaridade com as alterações fisiopatológicas que ocorrem após o infarto, em humanos⁸. Refletindo as disfunções pós IM, pode-se notar que não somente o miocárdio é afetado como também diversos tecidos, que sintetizam variadas citocinas e mantém um contínuo grau de inflamação, como as células musculares esqueléticas e endoteliais em resposta a estímulos hemodinâmicos, infecciosos, à hipóxia, ao estresse oxidativo e à ativação neuro-humoral, entre outros⁹. Referente a musculatura esquelética, estudos realizados em ratos com disfunção ventricular pós IM têm reproduzido que as fibras musculares esqueléticas do tipo I são as mais afetadas, pois desenvolvem algumas características similares às do tipo IIA, além da redução da densidade capilar e diminuição da atividade

máxima da enzima citocromo C oxidase¹⁰. Assim como o músculo esquelético na IC, o músculo do diafragma também apresenta modificações fisiológicas sob condições isquêmicas. Nessas condições, a adaptação deve-se ao aumento de fibras do tipo IIB, tipicamente de contração rápida, porém com menor capacidade oxidativa. O infarto do miocárdio aumentou o dano oxidativo, bem como diminuiu a atividade das enzimas antioxidantes no músculo diafragma em um estudo também experimental¹¹.

Tendo em vista que a reação inflamatória desencadeada pela lesão isquêmica leva à liberação de citocinas, um exemplo é a interleucina 12 (IL-12). Esta interleucina é composta por duas subunidades proteicas com ligação dissulfeto designadas p35 e p40, que são codificadas por dois genes diferentes, ela age como um intermediário importante entre a imunidade inata e adaptativa, já que é secretada sob estimulação de monócitos/macrófagos e células dendríticas¹². A IL-12 induz a produção de interferon-gama (IFN- γ) em células NK, na fase inicial da resposta imune, e também induz a ativação, diferenciação, produção de IFN- γ e expansão de células Th1 antígeno-específicas. Recentemente, foram descritas outras citocinas, produzidas por macrófagos e células dendríticas, que apresentam atividade semelhante a IL-12. A IL-23, IL-18 e IL-27 também induzem a produção de IFN- γ , podendo a IL-18 e a IL-27 atuar em sinergia com a IL-12¹³.

Após inúmeras pesquisas o estudo e avaliação da IL-12 em tecidos músculo esquelético e do diafragma, em modelos experimentais de indução do infarto do miocárdio, com ou sem o auxílio de G-CSF, mostrou-se raro ou até mesmo ímpar. Porém a verificação apenas dos níveis de IL-12 em outras patologias foi possível, como na deterioração da contratilidade do músculo do diafragma num modelo animal séptico¹⁴, ou na indução a regressão completa do carcinoma renal murino metastático, com auxílio da mesma¹⁵. Assim como um estudo realizado com base na distrofia

muscular no golden retriever, analisando diversos tecidos, indicam a melhora quando relacionada a diminuição da concentração de T-CD8 e T-CD4 onde a IL-12 tem um papel coadjuvante nos mecanismos desse processo inflamatório¹⁶.

3. Métodos

3.1 Modelo Experimental

O seguinte estudo é uma pesquisa básica, caracterizada por experimentação em modelo animal de laboratório. Foram utilizados 30 camundongos fêmeas Balb/c, com idade de 4-6 semanas, oriundos do Biotério da Universidade Estadual Paulista de Botucatu (UNESP). Os animais foram mantidos em gabinetes apropriados para animais de laboratório (Gabinete para Biotério/Insigth Ltda.) com controle automático de luz (ciclos claros e escuros de 12 horas) e umidade e temperatura (22°C) constante, alimentados com ração padrão e água ad libidum. Os animais foram primeiramente anestesiados via inalatória utilizando anestésico sevoflurano com fluxo contínuo de mistura com oxigênio, intubados e ventilados artificialmente (Rodent Ventilator modelo 683 – Harvard). A técnica utilizada para indução do infarto foi o modelo de ligadura da artéria coronária esquerda¹⁷. A temperatura do animal foi mantida entre 36,8 e 37 °C em cama cirúrgica aquecida (Cama aquecedora/ Insight Ltda.) durante o processo cirúrgico.

3.2 Administração do G-CSF

O G-CSF aplicado ao grupo IM+G-CSF, foi administrado, cinco dias transcorrido ao procedimento cirúrgico. Os animais foram submetidos à cirurgia de indução do infarto do miocárdio e após 7 dias de pós-operatório, foi administrado G-CSF durante 5 dias (200µg/kg, ip).

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais, como demonstrado na figura seguinte.

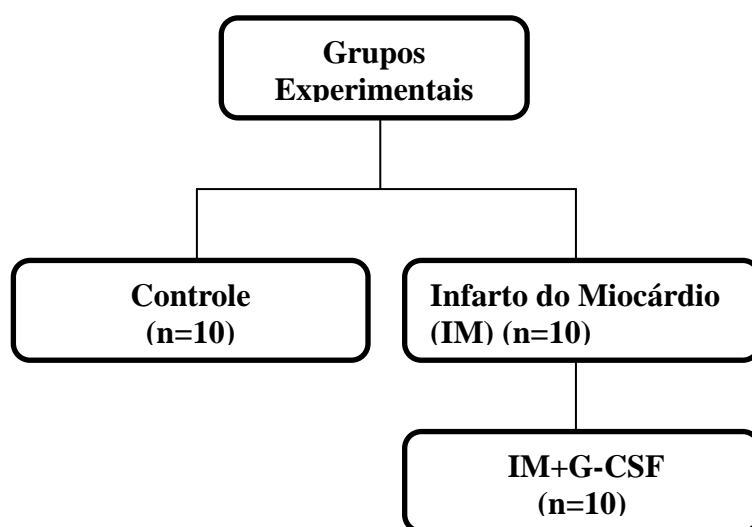


Figura1: Organograma de apresentação dos grupos experimentais.

3.3 Avaliação da Capacidade Funcional

O teste de esforço físico foi realizado após 2 dias de adaptação do animal com a esteira rolante, através de teste progressivo escalonado até a exaustão do mesmo¹⁸, com velocidade inicial de 11 m/min., sem inclinação, após 28 dias da indução do infarto. A cada três minutos, a velocidade foi aumentada em 5 m/min., até a exaustão total do animal, ou seja, o teste terminava quando o animal não conseguia manter o padrão da corrida. As variáveis avaliadas foram: a velocidade final (m/s) e a distância total percorrida (m) por cada animal durante o teste.

3.4 Avaliação Ecocardiográfica

Após um período de 30 dias, os animais foram anestesiados e ventilados, conforme descrito anteriormente para o estudo ecocardiográfico¹⁹. Para a análise, foi realizada a tricotomia da região anterior do tórax e colocação dos animais em decúbito dorsal na cama cirúrgica aquecida para o posicionamento apropriado do transdutor no

hemitórax esquerdo do animal. Foi utilizado o equipamento GE® VIVID 5 (Highland Park Dr. Bloomfield, USA), com transdutor de 8 MHz. A área de infarto foi estimada pela determinação do perímetro interno da região infartada em relação ao perímetro total do coração²⁰. Em cada exame ecocardiográfico foi coletado um total de três medidas, sendo calculados, posteriormente, a média e o desvio padrão da média. Foi mensurado o perímetro total do ventrículo esquerdo e o perímetro de escara cicatricial nos grupos infartados.

3.5 Dosagem de citocinas

Os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical, segundo os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Conseqüentemente, colheu-se coração, diafragma e músculo estriado esquelético isquiotibial bilateral. Dissecaram-se os corações, isolando os ventrículos esquerdo e direito. Os tecidos foram armazenados em tubos criogênicos contendo RPMI em freezer -80 °C. Os tubos criogênicos contendo os tecidos armazenados em RPMI foram descongelados a 20°C, os fragmentos de tecido foram transferidos a uma placa de Petri individualmente e concentrados em uma única região desta, de modo a evitar perda de amostra. Feito isto, os tecidos foram macerados manualmente, com o êmbolo de uma seringa o máximo possível, até adquirirem o estado máximo de homogeneidade. Adicionou-se 500µL de RPMI completo (pH=7,2), transferiu-se a amostra para um tubo falcon (1,5mL) previamente identificado e posteriormente foram centrifugados (3.500RPM/ 5min). Coletou-se o sobrenadante (400µL) em duas alíquotas, as quais foram armazenadas em tubo Eppendorf em freezer -80°C até a dosagem das citocinas. As concentrações de citocinas foram estabelecidas em pool de dois animais cada. A citocina inflamatória analisada foi a interleucina 12 (IL-12), a qual foi quantificada por meio do método Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) conforme protocolo do

kit. Utilizou-se leitora de placa ASYS Hitech (GmbH modelo Atlantis 4, Eugendorf, Austria). Para o procedimento foi utilizado o Kit BD OptEIA (BD Bioscience, San Diego, CA, USA).

3.6 Considerações éticas

O estudo que segue foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Amazonas (CEEAA-UFAM) no protocolo nº 017/2010, em consonância com os princípios de cuidados com animais de laboratório conforme a lei de nº 6.638 da República Federativa do Brasil de 08 de maio de 1979, que aborda as normas para as práticas didático-científico da vivisseção de animais.

3.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram armazenados no programa Excel[®] 2007 para Windows⁷[®]. Para a análise dos dados e confecção dos gráficos foi utilizado o programa GraphPadPrism[®] versão 5. Os resultados numéricos foram expressos como média \pm desvio padrão da média. A comparação das médias entre os grupos experimentais foi realizada empregando-se o teste de ANOVA de dois fatores e o teste de Kruskal-Wallis. As diferenças entre as comparações efetuadas foram consideradas estatisticamente significantes quando a probabilidade estatística foi menor que 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos foram armazenados no programa Excel[®] 2007 para Windows⁷[®]. Para a análise dos dados e confecção dos gráficos foi utilizado o programa GraphPadPrism[®] versão 5. Os resultados numéricos foram expressos como média \pm desvio padrão da média. A comparação das médias entre os grupos experimentais foi

realizada empregando-se o teste de ANOVA de dois fatores e o teste de Kruskal-Wallis. As diferenças entre as comparações efetuadas foram consideradas estatisticamente significantes quando a probabilidade estatística foi menor que 5% ($p < 0,05$).

No perímetro de infarto pode-se perceber um aumento significativo no grupo IM quando relacionado ao IM+GCSF, não havendo grupo controle (IM: $0,33 \pm 0,14$; IM+G-CSF: $0,15 \pm 0,03$; $p < 0,001$; fig.2).

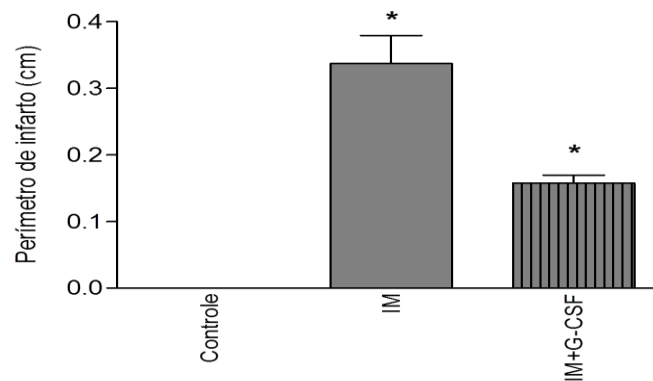


Fig.2 Gráfico de barras demonstrando a diminuição do perímetro de infarto quando o G-CSF é utilizado. (IM: $0,33 \pm 0,14$; IM+G-CSF: $0,15 \pm 0,03$; $p < 0,001$).

Na velocidade final verificou-se maior rendimento no grupo IM quando comparado ao grupo controle e uma estagnação no grupo IM+G-CSF quando comparado ao grupo IM (Controle: $0,66 \pm 0,06$; IM: $0,69 \pm 0,09$; IM+G-CSF: $0,55 \pm 0,09$; $p = 0,0041$, fig.3). Já na distância percorrida nota-se um aumento no grupo IM quando comparado ao controle, porém há um decréscimo do rendimento no grupo IM+G-CSF quando comparado ao grupo IM (Controle: $510,3 \pm 137,3$; IM: $572,9 \pm 206,0$; IM+G-CSF: $321,1 \pm 173,9$; $p = 0,0111$, fig.4).

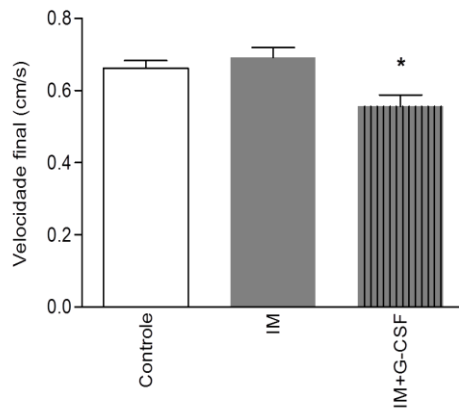


Fig.3 Gráfico de barras demonstrando que o grupo que se utilizou o G-CSF estagnou-se e os demais não tiveram diferenças significativas entre si. Controle: $0,66\pm0,06$; IM: $0,69\pm0,09$; IM+G-CSF: $0,55\pm0,09$; $p=0,0041$.

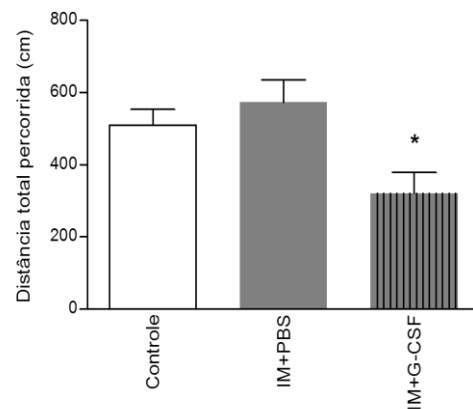


Fig.4 Gráfico de barras demonstrando o decréscimo no grupo IM+G-CSF comparado aos demais quanto à distância percorrida Controle: $510,3\pm137,3$; IM: $572,9\pm206,0$; IM+G-CSF: $321,1\pm173,9$; $p=0,0111$.

Houve aumento significativo no grupo IM da musculatura esquelética em comparação ao grupo controle, e observou-se diminuição da interleucina 12 no grupo IM+G-CSF quando comparado ao IM (Controle: $0,97\pm0,12$; IM: $1,58\pm0,41$; IM+G-CSF: $1,03\pm0,36$; $p=0,03$, fig5). A análise de IL-12 no diafragma apontou um aumento também significativo do grupo IM comparado ao grupo controle, além de demonstrar um aumento da interleucina 12 no grupo IM+G-CSF quando comparado ao IM (Controle: $1,63\pm0,33$; IM: $2,10\pm0,21$; IM+G-CSF: $1,67\pm0,32$; $p=0,5$, fig.6).

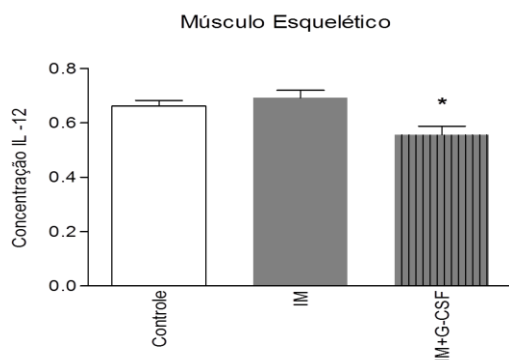


Fig.5 Gráfico de barras demonstrando o decréscimo de IL12 no grupo IM+G-CSF Controle: $0,97 \pm 0,12$; IM: $1,58 \pm 0,41$; IM+G-CSF: $1,03 \pm 0,36$; $p=0,03$.

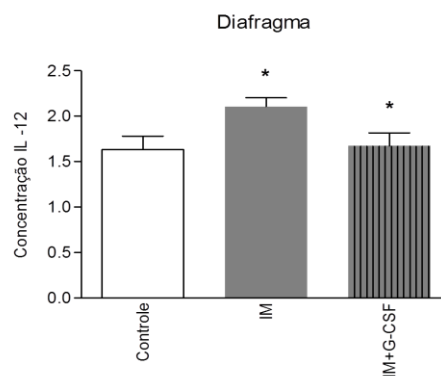


Fig.6 Gráfico de barras demonstrando que a utilização de G-CSF não traz alterações significativas Controle: $1,63 \pm 0,33$; IM: $2,10 \pm 0,21$; IM+G-CSF: $1,67 \pm 0,32$; $p=0,5$.

A insuficiência cardíaca é um mal epidêmico neste início de século²¹. As opções terapêuticas atuais propostas, tanto clínicas como cirúrgicas, têm como principal objetivo tratar apenas as consequências do infarto do miocárdio e não a causa básica, que é a perda da célula contrátil, o cardiomiócito. Recentemente, a recuperação da função contrátil tem sido evidenciada por meio da terapia celular. Os dois tipos celulares que estão sendo mais utilizados são os mioblastos esqueléticos e as células da medula óssea²².

A capacidade das células-tronco de medula óssea de se diferenciarem em cardiomiócitos tem sido demonstrada principalmente em modelos experimentais de infarto do miocárdio. Embora algum grau de controvérsia exista quanto à plasticidade dessas células, tais observações levaram investigadores a examinarem, em humanos, o papel dessas células no tratamento do infarto do miocárdio e da insuficiência cardíaca²³.

A presença de miocardite persistente e a demonstração da produção aumentada de citocinas pelo miocárdio de pacientes com IC de etiologia chagásica sugerem a existência de um ambiente atrativo para o "homing" e para a fixação das células-tronco²⁴.

No presente estudo utilizamos o G-CSF em conjunto ao grupo IM (IM+CSF), onde houve uma diminuição do perímetro de infarto neste mesmo grupo (Fig.2). Sabe-se que o G-CSF regula a produção de neutrófilos na medula óssea e estimula a proliferação, maturação e ativação dos mesmos, assim como está em correlação com a mobilização de células progenitoras desde a medula óssea até a circulação periférica²⁵. A administração de G-CSF tem sido estudada tanto no contexto de isquemia crônica, quanto no contexto de infarto agudo do miocárdio. Em um estudo inicial se observou uma taxa inesperada de reincidência de estenoses, fazendo com que o estudo fosse interrompido²⁶.

Se compararmos dois estudos e suas respectivas conclusões, poderemos observar algumas diferenças. Em um estudo concluiu-se que o grupo tratado com G-CSF traz uma melhora significativa quanto ao infarto do miocárdio, onde otimiza a função ventricular e diminui o remodelamento²⁷, entretanto outrem conclui que esta terapia não tem efeito nenhum sobre a função ventricular e nem sobre o remodelamento. As principais diferenças metodológicas era o tempo da administração de G-CSF e a idade dos pacientes²⁸. No experimento pudemos notar uma diminuição da IL12 no músculo esquelético, quando comparado ao grupo IM e ao grupo controle (Fig. 5). Além dos efeitos de mobilização das células progenitoras, o G-CSF possui um efeito neuroprotetor aparentemente multimodal, incluindo-se a atividade anti-apoptótica em neurônios, neo-vascularização, efeito anti-inflamatório e estimulação de neurogênese. Esses efeitos foram analisados em um estudo de plasticidade sináptica em

motoneurônios alfa medulares de camundongos MDX, onde analisando as fibras musculares, destes camundongos tratados ou não com o G-CSF, os resultados indicam que o tratamento com G-CSF é capaz de reduzir os efeitos inflamatórios e atuar positivamente no processo de regeneração nervosa periférica após esmagamento do nervo isquiático²⁹. Apesar da espera de um resultado satisfatório, houve um aumento da IL12 no diafragma, no grupo em que se utilizou o G-CSF sempre comparando ao grupo infartado e controle (Fig. 6). Em um estudo que analisou fibras do músculo diafragma de 81 ratos Wistar, foi demonstrada redução da força de contração da musculatura estriada e também aumento da produção de espécies ativas de oxigênio sob condições de hipoxemia³⁰.

Sabe-se que as maratonas, meia-maratonas e corridas de ultradistância são modelos de inflamação induzida que estimulam o aumento dos níveis circulantes de mediadores pró e anti-inflamatórios promovendo a liberação, a migração e a diferenciação das células-tronco da medula óssea. Esse tipo de exercício também aumenta os níveis plasmáticos de citocinas e de marcadores de ativação endotelial, oferecendo uma oportunidade de se avaliar os mecanismos fisiológicos relacionados ao reparo vascular, antes que um dano tecidual irreversível tenha ocorrido³¹. Todos os grupos foram submetidos ao teste de esforço, onde o grupo IM+G-CSF encontrou-se estagnado na hora de avaliar a velocidade final (Fig.3) e houve uma diminuição quando avaliado a distância percorrida (Fig.4) em comparação aos outros grupos, mostrando uma controvérsia em seu desempenho quando equiparado à melhora da função cardíaca.

Sabe-se que os efeitos benéficos do treinamento físico aeróbico (TF) estão em evidência, sendo este considerado uma intervenção fundamental para a cardiologia preventiva. Adicionalmente, o tempo para o início do TF, após o IM, parece ser uma variável importante, no que tange aos benefícios observados³². Em um estudo realizado

com ratos Wistar machos infartados ou não, submetidos a um teste de carga máxima, demonstrou-se que embora a área de infarto do miocárdio e a função sistólica não tenham sido alteradas, o índice de desempenho miocárdico e a pressão arterial sistólica foram melhorados pelo treinamento físico resistido no grupo infartado³³, já em uma pesquisa realizada com ratos Wistar fêmeas ovariectomizadas infartadas ou não, submetidas a um treinamento em esteira por 8 semanas, sugeriu que o treinamento físico em ratas ovariectomizadas submetidas ao infarto do miocárdio melhora o estado hemodinâmico e o controle reflexo da circulação, o que pode ser devido a um aumento na componente vagal³⁴. Em um estudo onde o G-CSF foi utilizado houve um indicativo de que o tratamento com G-CSF foi incapaz de prevenir um remodelamento cardíaco ou de melhorar a função cardiovascular em ratos em um modelo de infarto do miocárdio, a despeito da comprovada mobilização de células tronco da medula óssea para o sangue periférico, neste os ratos foram submetidos ao teste de exercício em esteira e depois tiveram sua performance cardíaca avaliada por eletro e ecocardiograma, hemodinâmica³⁵. No momento o uso de G-CSF é considerado como terapia em investigação³⁶.

5 Conclusão

Tendo em vista os aspectos observados, o G-CSF pareceu controlar e modular o aumento do perímetro de infarto em camundongos infartados, indicando benefícios com seu uso. No entanto o tratamento com G-CSF apresentou o pior rendimento dentre os grupos referente à avaliação funcional. Além disso, o tratamento induziu diminuição da concentração de IL-12 no músculo esquelético e no diafragma de camundongos infartados.

O presente projeto destaca além de um acréscimo a comunidade científica, uma nítida escassez de estudos sobre a IL-12 nestes determinados tecidos após a indução de infarto, sugerindo mais pesquisas.

6 Referências

1. Marcolino MS, et al. Implantação da Linha de Cuidado do Infarto Agudo do Miocárdio no Município de Belo Horizonte. *Arq Bras Cardiol.* 2013;100(4):307-314.
2. Garcia RP, et al. Vivências da família após infarto agudo do miocárdio. *Rev Gaúcha Enferm.* 2013;34(3):171-178.
3. Camacho CRC, et al. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. *Arq Ciênc Saúde* 2007 jan-mar;14(1):41-48.
4. Barberato SH, et al. CR. Avaliação não invasiva das pressões de enchimento e remodelação do ventrículo esquerdo após infarto do miocárdio. *Arq Bras Cardiol.* 2013;100(6):531-53.
5. Zornoff LAM, et al. Remodelação Ventricular após Infarto Agudo do Miocárdio. *Conceitos, Fisiopatologia e Abordagem Terapêutica*, 1997. *Arq Bras Cardiol* volume 68, (nº 6)
6. Leon, EB. Efeitos centrais e periféricos da implantação de células tronco hematopoéticas associados ao fator estimulador de colônias de granulócitos na insuficiência cardíaca experimental, 2013. Programa de Pós Graduação de Doutorado em Biotecnologia – UFAM.
7. Varella PP, et al. Citocinas: Uma revisão, 2001. *Rev. bras. alerg. imunopatol.* 2001; 24(4):146-154.

8. Zornoff LAM, et al. Infarto do Miocárdio Experimental em Ratos: Análise do Modelo, 2009. Arq Bras Cardiol 2009; 93(3) : 434-440.
9. Candia, AM et al. Ativação Imune-Inflamatória na Insuficiência Cardíaca, 2007. Arq Bras Cardiol 2007; 89(3) : 201-20.
10. Lope, RD et al. Alterações na Produção de IL-10 e TNF- α no músculo Esquelético em Ratos com Insuficiência Cardíaca Secundária ao Infarto do Miocárdio, 2009. Arq Bras Cardiol 2009; 94(3) : 313-32.
11. Silva, FL et al. Infarto do miocárdio experimental e aumento do estresse oxidativo em diafragma de ratos, 2005. Jorn Bras Pneumol. 2005;31(6):506-10.
12. Martin JG, et al. Interleucina-12 em crianças com sepse e choque séptico, 2012. Rev. Bras. Ter. Intensiva Apr./June 2012, vol.24 no.2 São Paulo.
13. Teixeira HC, et al. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso, 2007. Jorn Bras de Pneumolo.,vol.33 no.3
14. Nakahata E et al. Interleukin-12 prevents diaphragm muscle deterioration in a septic animal model. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 2001 Nov; 130(4) :653-63
15. Wigginton JM, et al. IFN- γ and Fas/fasl are required for the antitumor and antiangiogenic effects of IL-12/pulse IL-2 therapy J Clin Invest. Jul 1, 2001; 108(1): 51–62.
16. Miyazato, LG. Histopatologia e imunoistoquímica na distrofia muscular do golden retriever, 2010. Programa de Pós Graduação de Doutorado em Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – UNESP.

17. Lutz, M et al. Local injection of stem cell factor (SCF) improves myocardial homing of systemically delivered c-kit + bone marrow-derived stem cells. *Cardiovasc Rev* 2008, v. 77, n. 1, p. 143-50.

18. Ferreira, JC et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2007, v. 34, n. 8, p. 760-5.

19. Farahmand, P. et al. Skeletal myoblasts preserve remote matrix architecture and global function when implanted early or late after coronary ligation into infarcted or remote myocardium. *Circulation*, 2008 Sep 30;118(14 Suppl):S130-7. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.757617.

20. Payne, TR et al. A relationship between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and cardiac repair after muscle stem cell transplantation into ischemic hearts. *J Am Coll Cardiol*, 2007, v. 50, n. 17, p. 1677-84.

21. Vilas-Boas F, et al. Bone Marrow Cell Transplantation to the Myocardium of a Patient with Heart Failure Due to Chagas' Disease. *Arq Bras Cardiol*. 2004; 82: 185-7.

22. Guarita-Souza LC, et al. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, July/Sept. 2005, vol.20 no.3 São José do Rio Preto.

23. Vilas-Boas F, Efeitos e resultados iniciais do transplante de células de medula óssea para o miocárdio de pacientes com insuficiência cardíaca de etiologia chagásica, *Arq. Bras. Cardiol*. Aug. 2006, vol.87 no.2 São Paulo.

24. Vilas-Boas F, et al. Identification of regional differences in proinflammatory cytokine concentrations in chronic heart failure due to Chagas'

cardiomyopathy: a key element in the comprehension of the disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41: 155^a.

25. Garcia IAG, Estudio aleatorizado de la terapia celular en el infarto agudo de miocardio: análisis de los efectos proliferativos de la terapia celular sobre la proliferación intimal y la aterosclerosis coronaria, , 2013. Tesis Doctoral Universidad de Valladolid.

26. Kang HJ, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet*. 2004;363(9411):751-6.

27. Ince H, et al. Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI) Trial. *Circulation*. 2005;112(9 Suppl):I73-80.

28. Ince H, et al. Granulocyte-colony-stimulating factor in acute myocardial infarction: future perspectives after FIRSTLINE-AMI and REVIVAL-2. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007;4 Suppl 1:S114-8.

29. Simões GF. Plasticidade sináptica em motoneurônios alfa medulares de camundongos MDX tratados com fator estimulador de colônias granulocitárias (GCSF), 2012. Programa de Pós Graduação de Doutorado – UNICAMP.

30. Heunks LM, et al. Free radicals in hypoxic rat diaphragmcontractility: no role for xanthine oxidase. *Am J physiollung Cell Mol Physiol*. 2001;281(6):L1402-12.

31. Silva JFR, et al. Mobilização de Células Progenitoras Endoteliais com o Exercício em Sadios: uma Revisão Sistemática Arq Bras Cardiol 2012;98(2):182-191.

32. Haykowsky M, et al. A meta-analysis of the effects of exercise training on left ventricular remodeling following myocardial infarction: start early and go longer for greatest exercise benefits on remodeling. Trials. 2011;12:92.

33. Grans CF, et al. Treinamento Resistido Após Infarto do Miocárdio em Ratos: Papel na Função Cardíaca e Autonômica. Arq. bras. Cardiol Jul 2014, 103(1):68-68

34. Flores, LJ et al. Effects of exercise training on autonomic dysfunction management in an experimental model of menopause and myocardial infarction. Menopause. 2010 Jul;17(4):712-7.

35. Castro, JPSW. Mobilização de células-tronco da medula óssea é suficiente para a melhora funcional de corações de ratos infartados?, 2006. Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Fisiologia Cardíaca – UFRJ.

36. Bocchi EA, et al. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. Arq. Bras. Cardiol. 2009, vol.93 no.1 supl.1 São Paulo.

