



UFAM UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

IDENTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE IL-1 β NA MUSCULATURA
ESQUELÉTICA E DIAFRAGMÁTICA EM CAMUNDONGOS APÓS
CIRURGIA DE INDUÇÃO DE INFARTO DO MIOCÁRDIO.

Bolsita: Bianca Maria Schneider Pereira Garcia, FAPEAM

MANAUS
2014

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

RELATÓRIO FINAL

PIBIC 2014

IDENTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE IL-1 β NA MUSCULATURA
ESQUELÉTICA E DIAFRAGMÁTICA EM CAMUNDONGOS APÓS
CIRURGIA DE INDUÇÃO DE INFARTO DO MIOCÁRDIO.

Bolsista: Bianca Maria Schneider Pereira Garcia, FAPEAM
Orientadora: Prof. Dra. 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 cirurgia de indução de infarto do miocárdio, portanto houve a necessidade de modificações do projeto inicial. O projeto atual apresenta como objetivo a identificação dos níveis de IL-1 β na musculatura esquelética e diafragmática após cirurgia de indução de infarto do miocárdio. O material utilizado no projeto atual foi colhido da tese de doutorado da Orientadora Professora Dra. Elisa Brosina de Leon e apresenta dados inéditos.

RESUMO

IDENTIFICAÇÃO DO NÍVEIS DE IL-1B NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA E DIAFRAGMÁTICA APÓS CIRURGIA DE INDUÇÃO DE INFARTO DO MIOCÁRDIO.

Introdução e Objetivos: O modelo experimental de infarto tem sido o modelo animal de insuficiência cardíaca mais amplamente utilizado na pesquisa em cardiologia experimental, visto que a reação inflamatória desencadeada pela lesão isquêmica leva à liberação de citocinas, como por exemplo, a interleucina-1 β (IL-1 β). A ação da IL-1 β possui efeito no endotélio, bem como a indução das reações da fase aguda. A IL-1 β atua junto aos fibroblastos e células endoteliais estimulando a liberação de fatores de crescimento de colônias de granulócitos (G-CSF). 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 do presente estudo foi avaliar a concentração de IL-1 β no músculo esquelético e diafragma em camundongos infartados experimentalmente associado ou não ao uso de G-CSF. **Métodos:** Foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c, com 4-6 semanas de idade. O experimento constituiu-se pelos seguintes grupos experimentais (n=30): Grupo controle; Grupo infarto do miocárdio (IM); Grupo infarto do miocárdio + G-CSF (IM+G-CSF). Após 30 dias da indução do infarto, foi realizada a coleta das amostras de tecido muscular esquelético periférico (isquiotibiais) e diafragma. As concentrações da citocina IL-1 β foram quantificadas através do método *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* (ELISA) e os dados são demonstrados em densidade óptica. **Resultados:** Os resultados mostraram aumento significativo das concentrações de IL-1 β na musculatura esquelética quando comparado ao grupo controle e a administração de G-CSF parece regular essa concentração (Controle: $0,62 \pm 0,33$; IM: $1,2 \pm 0,41$; IM+G-CSF: $0,96 \pm 0,31$; $p=0,03$). A análise de IL-1 do diafragma demonstrou tendência de aumento da concentração dessa citocina nos grupos IM e IM+G-CSF (Controle: $1,073 \pm 0,31$; IM: $1,57 \pm 0,33$; IM+G-CSF: $1,61 \pm 0,30$; $p=0,06$). **Conclusão:** Os resultados mostraram que a administração do G-CSF parece modular a área de infarto, resultando em uma redução do perímetro de infarto no grupo IM+G-CSF. Os resultados mostraram também alterações nas concentrações de IL-1 β nos tecidos esqueléticos em animais submetidos à infarto do miocárdio. As análises sugerem que a administração de G-CSF parece suprimir a produção de citocina inflamatória IL-1 β no tecido muscular esquelético periférico. Contudo os resultados do teste de esforço no grupo IM+G-CSF surpreendentemente obtiveram um menor alcance na distância total percorrida e não houve diferença entre os grupos na velocidade final (m/s). Concluindo-se que os resultados encontrados nesse trabalho gera dados importantes, demonstrando os efeitos benéficos do tratamento com o G-CSF e que suas ações são ainda eficazes quando administradas após o infarto do miocárdio.

Palavras-chave: infarto do miocárdio, G-CSF, células tronco, regeneração cardíaca.

Apoio Financeiro: FAPEAM; HEMOAM; CNPq.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF LEVELS OF IL-1B IN SKELETAL MUSCLE AND AFTER SURGERY DIAPHRAGMATIC INDUCTION OF MYOCARDIAL INFARCTION.

Introduction and Objectives: The experimental model of myocardial infarction has been the animal model of heart failure more widely used in research in experimental cardiology, since the inflammatory reaction triggered by ischemic injury leads to the release of cytokines, such as interleukin-1 β (IL-1 β). The action of IL-1 β has no effect on the endothelium and induction of acute phase reactions. The IL-1 β works together with fibroblasts and endothelial cells stimulating the release of growth factors granulocyte colony (G-CSF) factors. 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-1 β in skeletal muscle and diaphragm in experimentally infarcted mice with or without the use of G-CSF.

Methods: female mice BALB / c were used, with 4-6 weeks of age. The experiment consisted of the following experimental groups (n = 30): control group; Group myocardial infarction (MI); Group myocardial infarction + G-CSF (G-CSF + IM). 30 days after induction of myocardial infarction, collecting samples of peripheral skeletal muscle tissue (hamstring) and diaphragm was performed. The concentrations of IL-1 β was quantified by enzyme-linked immunosorbent assay method (ELISA) and the data are presented in optical density.

Results: The results showed significant increase in concentrations of IL-1 β in skeletal muscle compared to the control group and the administration of G-CSG seems to regulate this concentration (control: 0.62 ± 0.33 , MI: 1.2 ± 0.41 , IM + G-CSF: 0.96 ± 0.31 , $p = 0.03$). The analysis of IL-1 demonstrated the diaphragm upward trend in the concentration of this cytokine in IM and IM + G-CSF (control group: 1.073 ± 0.31 , MI: 1.57 ± 0.33 , MI + G-CSF 1.61 ± 0.30 , $p = 0.06$).

Conclusion: The results showed that administration of G-CSG appears to modulate the infarcted area, resulting in a reduction of the perimeter of infarction in the MI + G-CSF group. The results also showed changes in the concentrations of IL-1 β in skeletal tissues in animals subjected to myocardial infarction. The analyzes suggest that the administration of G-CSF appears to suppress the production of inflammatory cytokine IL-1 β in the peripheral skeletal muscle tissue. However the results of the stress test in IM + G-CSF group surprisingly obtained a smaller range in the total distance traveled and there was no difference between groups in the final velocity (m / s). Concluding that the results found in this study generates important data demonstrating the beneficial effects of treatment with G-CSF and that their actions are still effective when administered after myocardial infarction.

Keywords: myocardial infarction, G-CSF, stem cells, cardiac regeneration.

Financial Support: FAPEAM; HEMOAM; CNPq.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.1 Modelo de Estudo e Informações Éticas.....	11
2.2 População de Estudo.....	11
2.3 Cirurgia de Indução do Infarto do Miocárdio.....	12
2.4 Administração do Fator de Crescimento (G-CSF).....	13
2.5 Avaliação da Capacidade Funcional.....	13
2.6 Avaliação Ecocardiográfica.....	13
2.7 Coleta de Tecidos.....	14
2.8 Dosagem da citocina IL-1 β na Musculatura Esquelética e Diafragmática.....	14
2.9 Análise Estatística.....	15
3.RESULTADOS.....	15
4. DISCUSSÃO.....	17
5. CONCLUSÃO.....	19
6. REFERÊNCIAS.....	20

1. Introdução

A Insuficiência cardíaca (IC) representa um importante problema de saúde público, com uma prevalência crescente e altos índices de morbidade e mortalidade (OLIVA, F. et al. 2012). É a via final comum da maioria das doenças que acometem o coração, sendo um dos mais importantes desafios clínicos atuais na área da saúde. Trata-se de um problema epidêmico em progressão (COWIE, 1997). A IC é a causa mais freqüente de internação por doença cardiovascular, e é a primeira causa de hospitalizações em idosos, elevando os custos com cuidados em saúde nos Estados Unidos e na Europa (ALLA, F et al, 2007).

Esta síndrome é resultado de alterações estruturais e funcionais que prejudicam a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, redução do débito cardíaco, que por sua vez não atende a demanda metabólica, resultando em hipertrofia do VE (AGVALL, B. et al.,2012; REHN, T. A. et al.,2009), acarretando alterações hemodinâmicas, periféricas e estimulado a elevação e ativação do sistema neuro-hormonal (GHEORGHIADÉ et al., 2005; FRANGOIANNIS, 2008).

A insuficiência cardíaca (IC), desencadeada em roedores como consequência de Infarto do Miocárdio, é o modelo mais comumente utilizado em pesquisa experimental, o qual contribui para análise da fisiopatologia e terapêutica desta síndrome (TUCCI, 2011). Este modelo de indução de IC resulta em alterações hemodinâmicas semelhante às apresentadas em humanos (MANIKANDAN et al.,2004).

As manifestações clínicas da IC são a dispnéia e fadiga, que levam a limitações e/ou intolerância ao exercício físico. Esses sintomas são resultados de uma disfunção

endotelial, acarretando uma vasoconstrição e aumento da resistência vascular, o que, contribui para uma diminuição ainda mais importante do aporte sanguíneo para a musculatura ativa (FRANGOIANNIS,2008; LOPES et al.,2010; FANG; MARWICK.,2002). Além disso a capacidade máxima ao exercício apresenta-se reduzida em torno de 50% ou mais, dependendo do grau de comprometimento da função ventricular (KITZMAN, D W; GROBAN, 2011)

Este evento geralmente ocorre após uma lesão no miocárdio (FANG; MARWICK, 2002). A oclusão parcial da artéria coronária esquerda, leva à isquemia miocárdica, diminuição da densidade mitocondrial, necrose dos cardiomiócitos e apoptose celular ativando uma reação inflamatória e mecanismos de reparação que resultam na formação de escara cicatricial, tendo como consequência, a insuficiência cardíaca (FANG; MARWICK, 2002; FLAHERTY et al.,2009; PANAGIOTA C.; G. FRANGOIANNIS, 2013).

Visto que esse processo culmina em reação inflamatória local e sistêmica, desencadeando à liberação de citocinas pró-inflamatória (FLAHERTY et al.,2009; CASTRO.,2006; DOURADO et al., 2006), como a interleucina-1 β (IL-1 β). Ocorrendo um desequilíbrio entre a formação de radicais livre e a capacidade antioxidante, resultando em sobrecarga oxidativa, envolvidos no processo da inflamação, disfunção muscular periférica, menor tolerância ao exercício, comprometendo a qualidade de vida do indivíduo com IC (DOURADO et al., 2006). As enzimas antioxidantes têm papel fundamental na proteção do organismo, pois constituem a primeira linha de defesa contra as espécies ativas de oxigênio.(SILVA, F.L et al.,2005)

Essas alterações se veem evidenciadas tanto no plasma, quanto no músculo esquelético e cardíaco de roedores e pessoas com IC. Estes mediadores inflamatórios

contribuem para a progressão da IC e aparecimento das manifestações clínicas, principalmente as alterações relacionadas à diminuição e funcionalidade de massa muscular (LOPES et al.,2010) e redução do aporte sanguíneo ao diafragma, aumentando, assim, o estresse oxidativo nesse músculo (SILVA et al.,2005).

A ação da IL-1 β possui efeito no endotélio, bem como a indução das reações da fase aguda. Os níveis plasmáticos dessa citocina em pacientes com IC está relacionado tanto com o prognóstico, quanto com a gravidade da doença (LOPES et al.,2010). A musculatura esquelética na IC, em modelos animais e humanos, apresentam alterações na sua composição, sendo as fibras do tipo I as mais afetadas, essas alterações são correlacionadas ao aumento da produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6. Desta forma, a IL-1 β foi apontada como resultado de uma condição inflamatória periférica, que idealmente seriam desencadeadas pela diminuição do fluxo sanguíneo no músculo devido ao aumento da espécie reativa de oxigênio((LOPES et al.,2010).

Um estudo com fibras diafragmáticas de ratos mostrou um aumento da produção de espécies ativas de oxigênio quando submetidas à situação hipoxêmica (MOHANRAJ, P et al., 1998). O infarto do miocárdio aumentou o dano oxidativo, bem como diminuiu a atividade das enzimas antioxidantes no músculo diafragma (SILVA et al.,2005).

Há evidências que algumas citocinas estariam relacionadas com o remodelamento cardíaco pós infarto e mobilização de células precursoras da medula óssea para a circulação periférica (MINATOUGHCHI et al .,2004). A IL-1 β atua junto aos fibroblastos e células endoteliais estimulando a liberação de fatores de crescimento de colônias de granulócitos (G-CSF). O G-CSF tem sido usado como tratamento para a insuficiência cardíaca após lesão isquêmica, por acelerar a regeneração tecidual do

músculo cardíaco e diminuir o remodelamento prejudicial, porém, pouco é conhecido sobre seus efeitos nos tecidos periféricos (CASTRO,2006; ORLIC et al.,2001; MIKI et al.,2004).

O objetivo do presente estudo foi: avaliar o perímetro de infarto do miocárdio em camundongos com insuficiência cardíaca associado ou não ao uso de G-CSF, avaliar a concentração de IL-1 β no músculo esquelético e diafragma em camundongos infartados experimentalmente associado ou não ao uso de G-CSF, avaliar a velocidade final e distância total percorrida por cada animal durante o teste progressivo escalonado em camundongos com insuficiência cardíaca associada ou não ao uso de G-CSF.

2. Material e Método

2.1 Modelo de Estudo e Informações Éticas.

Esse estudo se caracteriza por uma pesquisa básica, com experimentação em modelo animal de laboratório, pelo quais foi avaliado as concentração de IL-1 β no músculo esquelético e diafragma em camundongos infartados experimentalmente associado ou não ao uso de G-CSF. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Amazonas (CEEAA-UFAM), sob protocolo nº017/2010 em reunião de 07/05/2010, por concordar com os princípios de cuidados com animais de laboratório de acordo com a lei nº 6.638 da República Federativa do Brasil de 08 de maio de 1979, que trata de normas para as práticas didático-científico da vivisseção de animais.

2.2 População de Estudo

Neste estudo foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c, com 4-6 semanas de idade, provenientes do Biotério da Universidade Estadual Paulista de Botucatu

(UNESP). Esses camundongos foram mantidos em gabinetes específicos para animais de laboratório, com isolamento de ambiente, controle automático de luz (ciclos claros e escuros de 12 horas), temperatura (22°C) e umidade constante (Gabinete para Biotério/Insight Ltda.), alimentados com ração padrão e água *ad libitum*.

O experimento constituiu-se pelos seguintes grupos experimentais:

- A) Grupo controle: Os animais foram submetidos à cirurgia de indução do infarto do miocárdio, porém, sem ligadura da artéria coronária (n=10)
- B) Grupo infarto do miocárdio (IM): Os animais foram submetidos à cirurgia de infarto do miocárdio. (n=10)
- C) Grupo infarto do miocárdio+ G-CSF (IM+G-CSF): Os animais foram submetidos à cirurgia de infarto do miocárdio, após 7 dias pós-operatório, foi administrado G-CSF durante 5 dias, na dose de 200 µg/kg (ROBERTS et al., 1997) via intraperitoneal. (n=10).

2.3 Cirurgia de Indução do Infarto do Miocárdio

Os animais foram inicialmente anestesiados por 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 esquerda (LUTZ et al., 2008). A técnica consistiu na exposição do ventrículo esquerdo através de uma toracotomia esquerda, entre a quarta e quinta costelas. Nos animais em que o infarto do miocárdio foi induzido, foi realizada uma sutura permanente (fio mononylon 7.0) na artéria coronária descendente principal esquerda, em um ponto entre 1 e 2 mm distalmente ao bordo do átrio esquerdo. O espaço intercostal foi suturado, o

pneumotórax drenado, a musculatura peitoral foi reposicionada e a pele foi suturada com fio mononylon 6.0. A temperatura do animal foi mantida entre 36,8° e 37°C em cama cirúrgica aquecida (Cama aquecedora/Insight Ltda) durante o procedimento cirúrgico.

2.4 Administração do Fator de Crescimento (G-CSF)

A administração do G-CSF para o grupo IM+G-CSF, foi administrado na dose de 200 µg/kg, via intraperitoneal por um período de cinco dias posteriores ao procedimento de infarto.

2.5 Avaliação da Capacidade Funcional

A avaliação da capacidade funcional foi executado através do teste de esforço físico, 28 dias após a indução do infarto e realizado após 2 dias de adaptação do animal com a esteira rolante, através de teste progressivo escalonado até a exaustão do mesmo (FERREIRA et al., 2007), 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.

2.6 Avaliação Ecocardiográfica

Após um período de 30 dias, os animais foram anestesiados e ventilados, conforme descrito anteriormente para o estudo ecocardiográfico (FARAHMAND et al., 2008). 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 coração (PAYNE et al., 2007). 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.

2.7 Coleta de Tecidos

No final do experimento, após 30 dias da indução do infarto, será realizada a coleta de sangue via plexo ocular, os animais serão sacrificados por deslocamento cervical, conforme normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), para coleta do diafragma e músculo estriado esquelético isquiotibial bilateral. Após pesagem dos tecidos em balança analítica (Adventurer, modelo Ohaus), eles foram divididos em duas partes: (1) fixado em solução de formol a 10%, utilizada para análise histopatológica; (2) armazenada em pool de 2 animais, em solução de 300µL de RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®/St.Louis,MO EUA), para a análise das citocinas teciduais.

2.8 Dosagem da citocina IL-1 β na Musculatura Esquelética e Diafragmática.

As concentrações de citocinas foram determinadas em pool de 2 animais cada. Para tanto, o sangue foi coletado após 48hs do teste de esforço, centrifugado e o sobrenadante armazenado para a dosagem das citocinas. Os tecidos (diafragma e isquiotibiais) foram triturados manualmente, centrifugados e o sobrenadante armazenado para a dosagem da citocina. A citocina inflamatória analisada foi a IL-1 β , a qual foi quantificada através do método *Enzyme Linked Immunosorbant Assay* (ELISA) usando a leitora de placas ASYS Hitech (GmbH modelo Atlantis 4, Eugendorf, Austria). Para este procedimento foram utilizados os Kit BD OptEIA (BD Bioscience, San Diego, CA, USA).

2.9 Análise estatística

Os resultados obtidos, até o presente momento, 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. Previamente à aplicação dos testes estatísticos apropriados para a comparação entre os grupos experimentais, a normalidade da distribuição amostral e a homogeneidade da variância foram avaliadas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Bartlett, respectivamente.

A comparação das médias entre os grupos experimentais foi realizada empregando-se o teste de ANOVA de dois fatores, seguido de teste de TUKEY para dados paramétricos ou o teste de Mann-Whitney para os dados não paramétricos. As diferenças entre as comparações efetuadas foram consideradas estatisticamente significantes quando a probabilidade estatística foi menor que 5% ($p < 0,05$). Para análise de correlação foi utilizado teste chi-quadrado (χ^2) de Pearson.

3. Resultados

Os resultados mostraram que no perímetro de infarto o grupo controle não teve alterações, por não ter sido induzido a obstrução da artéria coronária esquerda e que o grupo IM sem o tratamento do G-CSF tem uma tendência a um perímetro de infarto maior que o grupo IM+GCSF, portanto a administração do GCS-F parece modular essa redução da área de infarto. (Controle: $0,00 \pm 0,00$; IM: $0,33 \pm 0,14$; IM+G-CSF: $0,15 \pm 0,03$; $p < 0,0001$).

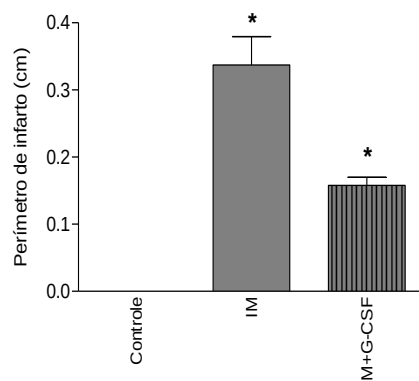


Fig. 1 Gráfico de barras mostrando a redução do perímetro de infarto no grupo que recebeu a administração do GCS-F

Houve aumento significativo das concentrações de IL-1 β na musculatura esquelética quando comparado ao grupo controle e a administração de G-CSF parece regular essa concentração (Controle:0,62 $\pm$ 0,33; IM:1,2 $\pm$ 0,41; IM+G-CSF:0,96 $\pm$ 0,31; p=0,03). A análise de IL-1 β do diafragma demonstrou tendência de aumento da concentração dessa citocina nos grupos IM e IM+G-CSF (Controle:1,073 $\pm$ 0,31; IM:1,57 $\pm$ 0,33; IM+G-CSF:1,61 $\pm$ 0,30; p=0,06).

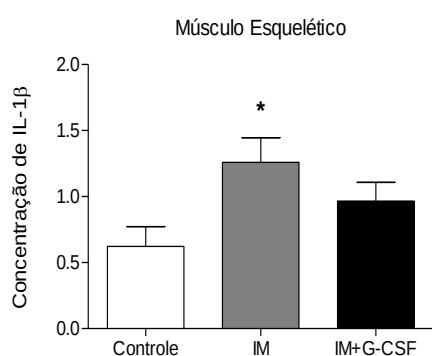


Fig. 2 Gráfico de barras mostrando um aumento de IL-1 β nos grupos IM e IM+GCSF e o GCS-F parece regular essa concentração.

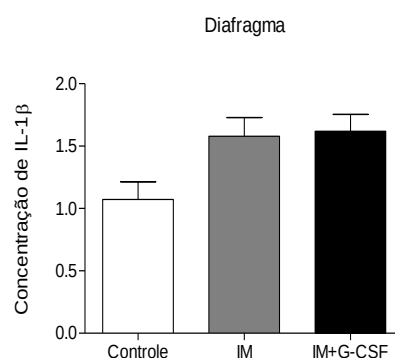


Fig.3 Gráfico de barras mostrando aumento de IL-1 β nos grupos e a administração do GCS-F parece não modular essa concentração.

No teste de esforço físico realizado pelos grupos observou-se que na velocidade final (m/s) não houve uma diferença significativa entre o grupo que recebeu tratamento com G-CSF e o grupo controle e IM (Controle:0,66 $\pm$ 0,06; IM:0,69 $\pm$ 0,09; IM+GCSF:0,55 $\pm$ 0,09; p=0,0041). E que na distância total percorrida (cm) o grupo

IM+G-CSF percorreu uma distância (cm) menor comparada ao grupo IM (Controle: 51,3,±13,3; IM: 57,9±20,0; IM+G-CSF:32,1±17,3; $p=0,01$).

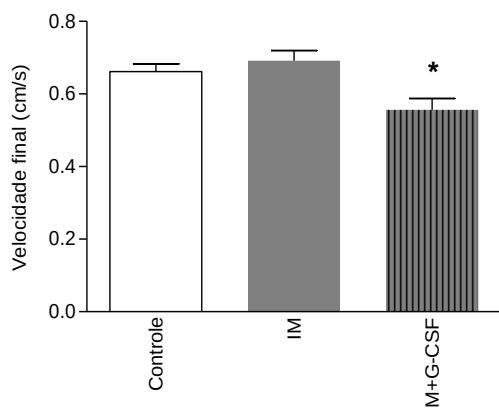


Fig. 4 Gráfico de barras mostrando que não há diferença significativa na velocidade final entre os grupos.

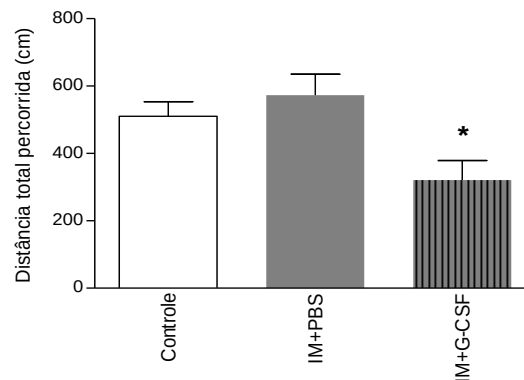


Fig. 5 Gráfico de barras mostrando que o grupo que recebeu o tratamento com GCS-F percorreu uma distância (cm) menor que os outros grupos.

4. Discussão

O infarto do miocárdio é a causa de morte mais importante nos países desenvolvidos. Dentre outras causas, a grande prevalência de cardiopatias pode ser explicada pela pouca capacidade regenerativa dos miócitos cardíacos perdidos pelos processos patológicos que acometem o coração. Além disso, o reparo, com intensa deposição de fibrose, que acompanha na maioria das vezes a lesão cardíaca, tem também um papel fundamental na perda da qualidade funcional deste órgão (LIMA RS et al., 2008). Trabalhos na literatura têm demonstrado o potencial da terapia celular em cardiopatias (SUNKOMAT JN, GABOLLA MA., 2003), pois exibe uma melhora na funcionalidade cardíaca.

As células-tronco de medula óssea tem a capacidade de se diferenciarem em cardiomiócitos, e isso tem sido demonstrada principalmente em modelos experimentais de infarto do miocárdio (VILAS-BOAS, F et al., 2006). A presença de miocardite

persistente e a demonstração da produção aumentada de citocinas pelo miocárdio de pacientes com IC sugerem a existência de um ambiente atrativo para o "homing" e para a fixação das células-tronco⁹ (VILAS-BOAS, F et al.,2003).

No presente estudo foi visto que no grupo IM+G-CSF houve a redução do perímetro de infarto (Fig.1), isto porque o G-CSF atua como potente estimulador da resposta imune e catalisador da proliferação celular, estando ele relacionado com o remodelamento cardíaco pós-infarto e mobilização de células precursoras da medula óssea para a circulação periférica (MINATOUGHCHI et al.,2004).

Em um estudo de modelo experimental de infarto do miocárdio foi encontrado novos cardiomiócitos na área isquêmica subsequente à administração de G-CSF cinco dias após o infarto, resultando em uma aceleração no reparo tecidual (MINATOUGHCHI et al.,2004). Além disso o G-CSF pode ter um efeito terapêutico pleiotrópico, resultando em um mecanismo benéfico citoprotetor (KHAN et al.,2009).

A administração de G-CSF (Fig.2) mobiliza células-tronco e progenitoras da medula óssea para o sangue periférico, que, por sua vez reduz a ação dos mediadores inflamatórios, bem como diminuiu os níveis de IL-1 β em várias condições (MASET AL et al., 2009). Atuando como um potente mobilizador de células progenitoras hematopoiéticas. Podendo isso ser observado no resultado encontrado no presente estudo, porém não havendo a diminuição da concentração de IL-1 β no diafragma, o que gera a hipótese de um aumento de espécies ativas de oxigênio no diafragma quando comparado ao músculo esquelético (Fig. 2 e 3).

Os grupos foram submetidos ao teste de esforço e surpreendentemente não houve diferença significativa entre eles na velocidade final (m/s) (Fig.4) e na distância total percorrida (Fig.5), sendo que o grupo tratado com G-CSF percorreu uma distância

menor que os outros grupos, demonstrando uma controvérsia, apesar da pesquisa apontar para uma melhora significativa na função cardíaca.

Em um estudo, ratos foram submetidos a um teste de esforço progressivo máximo em esteira, e o resultado demonstrou pequenas diferenças na capacidade contrátil dos corações, já que o débito cardíaco é um dos principais limitantes do exercício. Todavia, não houve diferenças significativas entre os grupos infartados tanto no consumo máximo de oxigênio quanto no tempo de permanência em exercício (CASTRO., 2006). Logo, os dois únicos trabalhos que avaliaram os animais tratados com citocinas mobilizadoras de células da medula óssea sob condições de estresse, não obtiveram sucesso no tratamento (DETEN ET AL., 2005; CASTRO.,2006), reportando, de maneira consistente, que não há melhora da função cardíaca através do aumento do número de precursores da medula óssea para o sangue periférico (DETEN ET AL., 2005). No estudo de Castro (2006) eles também demonstraram que o tratamento com G-CSF não previne a falência cardíaca progressiva após o infarto do miocárdio em ratos, encontrando um insucesso na clínica.

Contudo o estudo de Deten et al (2005) foi desenvolvido com ratos infartados por oclusão permanente, gerando a hipótese que essa oclusão permanente poderia dificultar a migração celular para o tecido lesionado.

5. Conclusão

Os resultados mostraram que a administração do G-CSF parece modular a área de infarto, resultando em uma redução do perímetro de infarto no grupo IM+G-CSF. Os resultados mostraram também alterações nas concentrações de IL-1 β nos tecidos esqueléticos em animais submetidos à infarto do miocárdio. As análises sugerem que a administração de G-CSF parece suprimir a produção de citocina inflamatória IL-1 β no

tecido muscular esquelético periférico. Contudo os resultados do teste de esforço no grupo IM+G-CSF surpreendentemente obtiveram um menor alcance na distância total percorrida e não houve diferença entre os grupos na velocidade final (m/s).

Os resultados encontrados nesse trabalho gera dados importante, demonstrando os efeitos benéficos do tratamento com o G-CSF e que suas ações são ainda eficazes quando administrado após o IM.

6. Referências

1. AGVALL, B. et al. The benefits of using a heart failure management programme in Swedish primary healthcare. **Eur J Heart Fail**, 2012.
2. ALLA, F.; ZANNAD, F.; FILIPPATOS, G. Epidemiology of acute heart failure syndromes. **Heart Fail Rev**, v. 12, n. 2, p. 91-5, Jun 2007.
3. CASTRO, J. P. S. W. D. Mobilização de células-tronco da medula óssea é suficiente para a melhora funcional de corações de ratos infartados? Dissertação de Doutorado, 2006 - Ciências Biológicas Univerdade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
4. COWIE MR. The epidemiology of heart failure - An epidemic in progress. In: Coats A, Cleland JGF (ed). Controversies in the management of heart failure. **Churchill Livingstone**, p.11-23, 1997.
5. DETEN A, VOLZ HC, CLAMORS S, LEIBLEIN S, BRIEST W, MARX G, ZIMMER HG (2005) Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart **Cardiovasc Res**. Jan 1;65(1):52-63
6. DOURADO, V.Z et al. Systemic manifestations in chronic obstructive pulmonary disease. **J Bras Pneumol**.;32(2):161-71.,2006.
7. FANG; MARWICK. Vascular dysfunction and heart failure: epiphenomenon or etiologic agent? **Am Heart J**, v. 143, n. 3, p. 383-90, 2002.
8. 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**, v. 118, n. 14 Suppl, p. S130-7, Sep 30 2008.

9. FLAHERTY, J. D. et al. Acute heart failure syndromes in patients with coronary artery disease early assessment and treatment. **J Am Coll Cardiol**, v. 53, n. 3, p. 254-63, 2009.
10. FRANGOIANNIS, N. G. The immune system and cardiac repair. **Pharmacological Research**, v. 58, p. 88-111, 2008
11. FERREIRA, J. C. et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 34, n. 8, p. 760-5, 2007.
12. FISCHER, A. H. et al. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. **CSH Protoc**, 2008.
13. KHAN, M. et al. IGF-1 and G-CSF complement each other in BMSC migration towards infarcted myocardium in a novel in vitro model. **Cell Biol Int**, v. 33, n. 6, p. 650-7, Jun 2009.
14. KITZMAN, D. W.; GROBAN, L. Exercise intolerance. **Heart Fail Clin**, v. 4, n. 1, p. 99-115, Jan 2008.
15. LOPES, R.D et al. Alteraciones en la Producción de IL-10 y TNF- α en el Músculo Esquelético en Ratones con Insuficiencia Cardiaca Secundaria al Infarto de Miocardio. **Arq Bras Cardiol**, 94(3) : 293-301, 2010.
16. 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 Res**, v. 77, n. 1, p. 143-50, 2008.
17. MANIKANDAN, P. et al. Time course studies on the functional evaluation of experimental chronic myocardial infarction in rats. **Mol Cell Biochem**, v. 267, n. 1-2, p. 47-58, Dec 2004.
18. MASET AL et al **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 2009;31(Supl. 1):104-111
19. MIKI, T. et al. Granulocyte colony stimulating factor/macrophage colony stimulating factor improves postinfarct ventricular function by suppression of border zone remodelling in rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 31, n. 12, p. 873-82, 2004.
20. MINATOBUCHI et al. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. **Circulation**, v. 109, n. 21, p. 2572-80, 2004.
21. MOHANRAJ P, Merola AJ, Wright VP, Clanton TL. Antioxidants protect rat diaphragmatic muscle function under hypoxic conditions. **J Appl Physiol**;84(6):1960-6.,1998.
22. OLIVA, F. et al. Acute heart failure patient profiles, management and in-hospital outcome: results of the Italian Registry on Heart Failure Outcome. **Eur J Heart Fail**, v. 14, n. 11, p. 1208-17, 2012.

23. ORLIC, D. et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 18, p. 10344-9, 2001.
24. PANAGIOTA C.; G. FRANGOIANNIS. Targeting inflammatory pathways in myocardial Infarction. **Eur J Clin Invest**; 43 (9): 986–995,2013.
25. PAYNE, T. R. 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**, v. 50, n. 17, p. 1677-84, Oct 23 2007.
26. REHN, T. A. et al. Temporary fatigue and altered extracellular matrix in skeletal muscle during progression of heart failure in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 297, n. 1, p. R26-33, 2009.
27. ROBERTS, A. W. et al. Genetic influences determining progenitor cell mobilization and leukocytosis induced by granulocyte colony-stimulating factor. **Blood**, v. 89, n. 8, p. 2736-44, Apr 1997.
28. SILVA, F.L et al. Experimental myocardial infarction and increased oxidative stress in the rat diaphragm. **J Bras Pneumol**, 31(6):506-10,2005.
29. SUNKOMAT, JN; GABOLLA MA. Stem cell therapy in ischemic heart cardiovasc. **Cardiovasc Drug Rev**, 21(4):327-42,2003.
30. TUCCI, P. Pathophysiological characteristics of the post-myocardial infarction heart failure model in rats. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** 96(5): 420-424.,2011.
31. VILAS-BOAS F, RIBEIRO-DOS-SANTOS R, SOARES MBP et al. Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to chagas disease. **Arq. Bras. Cardiol.** vol.87 no.2 São Paulo Aug. 2006.
32. VILAS-BOAS F, RIBEIRO-DOS-SANTOS R, SOARES MBP 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.
33. WICK, M., Ed. **Diagnostic Histochemistry**. New York: Cambridge University, 1 ed. 2008.

