

ARTIGOS ORIGINAIS CONCISOS

Perfil da Activação das Citocinas Pró-Inflamatórias na Sobrecarga Cardíaca Aguda [98]

ROBERTO RONCON-ALBUQUERQUE JR., MARIANA VASCONCELOS, ANDRÉ P. LOURENÇO, ANA BRANDÃO-NOGUEIRA,
ANTÓNIA TELES, BERNARDO FARIA, TIAGO HENRIQUES-COELHO, ADELINO F. LEITE-MOREIRA

Serviço de Fisiologia, Faculdade de Medicina do Porto, Porto, Portugal

Rev Port Cardiol 2005; 24(11): 1369-1378

RESUMO

Introdução: As citocinas pró-inflamatórias têm sido implicadas na remodelagem ventricular que acompanha a progressão para a insuficiência cardíaca. No presente estudo, investigámos os efeitos da sobrecarga aguda de volume e de pressão do VD na função biventricular e na activação da expressão miocárdica da Interleucina-6 (IL-6) e do Factor de Necrose Tumoral alfa (TNF- α).

Material e Métodos: Ratos Wistar machos (n = 45), instrumentados com micromanómetros de pressão no VD e no VE, foram aleatorizados a um de três protocolos: *i*) sobrecarga aguda de pressão do VD (SPr), induzida por *banding* do tronco pulmonar, de forma a duplicar a pressão sistólica máxima do VD, durante 120 ou 360 min; *ii*) sobrecarga aguda de volume (SVol), com perfusão de dextrano40 (5 ml/h), durante 120 ou 360 min; *iii*) Sham. Amostras da parede livre do VD e VE foram colhidas para quantificação de ARNm.

Resultados: No VD, a sobrecarga aguda induziu a activação da expressão génica da IL-6 e do TNF- α , superior na SVol (IL-6: + 669,7 \pm 263,4 %; TNF- α : + 5149,9 \pm 1099,0 %; 360 min) do que na SPr (IL-6: + 64,9 \pm 44,2 %; TNF- α : + 628,1 \pm 229,3 %; 360 min). No grupo SPr, os níveis de ARNm do TNF- α no VE encontram-se elevados, na ausência de sobrecarga desta câmara cardíaca. No VE não se observou correlação entre os níveis de IL-6 e de TNF- α , enquanto que no VD se verificou uma correlação positiva (r = 0,574; p < 0,001).

ABSTRACT

Activation Profile of Pro-Inflammatory Cytokines In Acute Cardiac Overload

Introduction: Pro-inflammatory cytokines have been implicated in ventricular remodeling during heart failure progression. In the present study, we investigated the effects of acute volume and RV pressure overload on biventricular hemodynamics and myocardial gene expression of IL-6 and TNF- α .

Methods: Male Wistar rats (n = 45) instrumented with RV and LV tip micromanometers were randomly assigned to one of three protocols: *i*) acute RV pressure overload (PrOv) induced by pulmonary trunk banding in order to double RV peak systolic pressure, for 120 or 360 min; *ii*) acute volume overload (VolOv) induced by dextran40 infusion (5 ml/h), for 120 or 360 min; *iii*) Sham. Free wall samples from the RV and LV were collected for mRNA quantification. **Results:** In the RV, acute overload induced IL-6 and TNF- α gene expression, higher in VolOv (IL-6: + 669.7 \pm 263.4 %; TNF- α : + 5149.9 \pm 1099.0 %; 360 min) than in PrOv (IL-6: + 64.9 \pm 44.2 %; TNF- α : + 628.1 \pm 229.3 %; 360 min). In PrOv, TNF- α mRNA levels in the LV were increased, in the absence of ventricular overload. IL-6 and TNF- α mRNA levels did not correlate in the LV, while in the RV a positive correlation was found (r = 0.574; p < 0.001).

Conclusions: Acute cardiac overload induces overexpression of pro-inflammatory cytokines. This gene activation is not uniform, being higher in volume overload and

Conclusões: A sobrecarga cardíaca aguda induz uma sobreexpressão miocárdica das citocinas pró-inflamatórias. Esta activação não é homogénea, sendo superior na sobrecarga de volume e envolvendo mecanismos dependentes e independentes da carga.

Palavras-Chave

Expressão génica; Interleucina-6; Mecanotransdução; Factor de Necrose Tumoral Alfa

involving both load-dependent and load-independent mechanisms.

Key words

Gene expression; Interleukin-6; Mechanotransduction; Tumor necrosis factor alpha

INTRODUÇÃO

A sobrecarga cardíaca é um dos estímulos mais importantes para a progressão da insuficiência cardíaca (IC)^(1,2). Nesta síndrome, a activação crónica de sinais promotores do crescimento induz quer hipertrofia, quer alteração do perfil de expressão génica dos cardiomiócitos com diferenciação terminal. As alterações no programa de transcrição incluem a regressão para o fenótipo molecular fetal, o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e de factores de crescimento, e a alteração da expressão dos genes reguladores da cinética do cálcio. Apesar da hipertrofia contribuir, pelo menos nas fases iniciais da progressão da IC, para a preservação da função ventricular, a alteração do perfil de expressão génica miocárdica tem sido implicada na disfunção contráctil, apoptose e necrose dos cardiomiócitos, na fibrose miocárdica e na arritmogénese⁽³⁾.

A activação da imunidade inata foi demonstrada durante a progressão da IC, através da produção local no miocárdio de espécies reactivas de oxigénio, citocinas pró-inflamatórias, da activação da sintetase indutível do NO (iNOS) e da cascata do complemento⁽⁴⁾. No que concerne às citocinas pró-inflamatórias, sabe-se que o aumento da sua expressão em resposta à sobrecarga ou isquemia tem um efeito bifásico: na fase aguda a sua acção é citoprotectora enquanto que o seu aumento sustentado tem um efeito deletério promovendo a morte celular, a diminuição da contractilidade e a degradação da matriz extracelular^(5,6). As citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-6, não são expressas constitutivamente no coração normal^(7,8), sendo que a sua produção representa uma resposta intrínseca ou inata ao *stress* miocárdico sustentado⁽⁹⁾. Não obstante, os mecanismos de regulação aguda da expressão

INTRODUCTION

Cardiac overload is one of the main stimuli for heart failure (HF) progression^(1,2). In this syndrome, chronic activation of growth-promoting signals induces both hypertrophy and alterations in gene expression in cardiomyocytes following terminal differentiation. Changes in the transcription program include regression to the fetal molecular phenotype, increased expression of pro-inflammatory cytokines and growth factors, and alterations in the expression of genes regulating calcium kinetics. Although hypertrophy helps to preserve ventricular function, at least in the initial stages of HF, alterations in the profile of myocardial gene expression have been implicated in contractile dysfunction, cardiomyocyte apoptosis and necrosis, myocardial fibrosis and arrhythmogenesis⁽³⁾.

Activation of innate immunity has been demonstrated during HF progression, through local production in the myocardium of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines and activation of inducible NO synthase (iNOS) and the complement cascade⁽⁴⁾. Regarding pro-inflammatory cytokines, it is known that the effect of increased expression in response to overload or ischemia has two phases: in the acute phase their action is cytoprotective, while sustained increase has a deleterious effect, leading to cell death, reduced contractility and degradation of the extracellular matrix^(5,6). Pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 are not expressed constitutively in the normal heart^(7,8); their production is an intrinsic response to sustained myocardial stress⁽⁹⁾. Nevertheless, the mechanisms behind acute regulation of expression of these cytokines in response to cardiac overload are still largely unknown⁽¹⁰⁾.

destas citocinas em resposta à sobrecarga cardíaca permanecem ainda largamente desconhecidos⁽¹⁰⁾.

Dado que as alterações precoces do perfil de expressão génica do miocárdio poderão estar na base da remodelagem ventricular subsequente, o presente estudo foi levado a cabo para estudar a activação dos genes de citocinas pró-inflamatórias em resposta à sobrecarga cardíaca aguda de pressão e de volume. Especificamente, analisámos e correlacionámos os dados hemodinâmicos biventriculares com os níveis de ARNm da IL-6 e TNF- α após 120 minutos (min) e 360 min de sobrecarga de volume ou sobrecarga selectiva de pressão do ventrículo direito (VD), no coração *in situ* de rato.

MATERIAL E MÉTODOS

Protocolo experimental

Este trabalho respeita a Directiva 86/609/CEE, do Conselho de 24 de Novembro de 1986, que estabelece as normas mínimas relativas à protecção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos, transposta para a ordem jurídica interna pelo DL 129/92 de 6 de Junho, regulamentado pela Portaria 1005/92 de 23 de Outubro. Está também de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicado pelos Institutos Nacionais de Saúde dos EUA (NIH Publication No. 85-23, revisto em 1996).

Ratos *Wistar* macho (n=45; *Charles River Laboratories*; Barcelona, Espanha) de oito semanas, foram agrupados em grupos de cinco animais por gaiola em ambiente controlado com ciclos de luz-penumbra de 12 h, temperatura ambiente de 22 °C, sem restrição de água ou ração.

Os animais foram aleatorizados a um de três protocolos experimentais: (i) sobrecarga aguda de pressão (SPr), induzida por *banding* do tronco pulmonar de modo duplicar a pressão sistólica máxima do VD (P_{max}), durante 120 (n=7) ou 360 (n=8) min; (ii) sobrecarga de volume (SVol) com perfusão de dextrano40 (5ml/h), durante 120 (n=8) ou 360 (n=9) min; (iii) grupos *sham* de 120 (n=7) e 360 (n=6) min. A taxa de mortalidade foi de 13,3% no grupo SPr (dois animais no protocolo de 360 min) e 23,5% no grupo SVol (um animal no protocolo de 120 min e três animais no de 360 min). Não se observaram mortes no grupo *Sham* durante o protocolo experimental.

Após instrumentação hemodinâmica os animais foram eutanasiados com overdose

Since early alterations in myocardial gene expression may be behind subsequent ventricular remodeling, the present study was designed to investigate the activation of pro-inflammatory cytokine genes in response to acute cardiac pressure and volume overload. Specifically, we analyzed and correlated biventricular hemodynamic data and IL-6 and TNF- α mRNA levels after 120 and 360 min of volume overload or selective right ventricular (RV) pressure overload in *in situ* rat heart.

METHODS

Experimental protocol

This work complies with European Community Directive 86/609/EEC, which lays down minimum standards for protection of animals used for experimental and other scientific purposes, incorporated into Portuguese law by Decree-law 129/92 of 6 June 1992 and implemented by Order in Council 1005/92 of 23 October 1992. It also complies with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

Eight-week-old male *Wistar* rats (n=45; *Charles River Laboratories*; Barcelona, Spain) were divided into groups of 5 animals per cage in a controlled environment with 12-hour cycles of light and dark, ambient temperature of 22 °C, and unrestricted access to food and water.

The animals were randomized to one of three experimental protocols: (i) acute pressure overload (PrOv) induced by pulmonary trunk banding in order to double RV peak systolic pressure (P_{max}), for 120 (n=7) or 360 (n=8) min; (ii) acute volume overload (VolOv) induced by dextran40 infusion (5 ml/h), for 120 (n=8) or 360 (n=9) min; (iii) sham procedure of 120 (n=7) or 360 (n=6) min. Mortality was 13.3% in the PrOv group (2 in the 360-min protocol) and 23.5% in the VolOv group (1 in the 120-min protocol and 3 in the 360-min protocol). There were no deaths in the Sham group during the experiment.

Following hemodynamic instrumentation the animals were sacrificed with an anesthetic overdose and free wall samples from the RV and left ventricle (LV) were collected and stored at -70 °C for mRNA quantification.

Recording and analysis of hemodynamic data

The animals were anesthetized with 6 mg/100 g pentobarbital ip, placed on a heated

anestésica, tendo sido colhidas e armazenadas (-70 °C) amostras da parede livre do VD e do ventrículo esquerdo (VE) para a quantificação de ARNm.

Registo e análise dos dados hemodinâmicos

Os animais foram anestesiados com pentobarbital (6 mg/100 g, ip), colocados sobre uma placa aquecida, traqueostomizados para ventilação mecânica (*Harvard Small Animal Ventilator, Model 638*) com ar enriquecido a oxigénio a 60 cpm, com volume corrente de 1 ml/100 g. A frequência respiratória e volume corrente foram ajustados de forma a manter o pH e a composição gasosa do sangue arterial dentro dos limites fisiológicos. A anestesia foi mantida através de um *bolus* adicional de pentobarbital (2 mg/100 g) quando necessário. Para compensar as perdas de líquidos perioperatórias, a veia jugular direita foi cateterizada, sob visão binocular cirúrgica microscópica (*Wild M651.MS-D, Leica; Herbrugg, Suíça*), e iniciou-se uma perfusão contínua de soro fisiológico (NaCl 0,9%). O coração foi exposto através de uma esternotomia mediana e abertura completa do pericárdio. O tronco pulmonar foi dissecado e laçado com uma seda I para permitir a constrição do vaso durante o protocolo SP. As pressões do VD e VE foram medidas através de micromanómetros 2-Fr de alta-fidelidade (*SPR-324 Millar Instruments*) inseridos através da parede livre do VD e do ápice do VE, respectivamente.

Após a estabilização das preparações animais (~15 min) procedeu-se ao início dos protocolos experimentais. Os registos hemodinâmicos foram efectuados com a respiração suspensa no final da expiração. A conversão digital dos dados foi efectuada a uma frequência de 1 kHz. Foram registados os seguintes parâmetros de função VD e VE: pressão telediastólica (PVDTD e PVETD; mmHg); pressão sistólica máxima (PVD_{max} e PVE_{max}, mmHg).

Quantificação do ARNm

O ARNm total (ARNM_{total}) foi extraído pelo método de guanidíio-tiocianato e ligação a membrana de sílica-gel, de acordo com as instruções do fabricante (*Qiagen 74124*). A pureza e a concentração do ARNm_{total} foram determinadas por espectrofotometria (*Eppendorf 613000.012*).

A quantificação relativa do ARNm específico foi efectuada por *two-step real time RT-PCR*. A transcrição reversa (10 min a 22 °C, 50 min a

tray, and tracheostomized for mechanical ventilation (*Harvard Small Animal Ventilator, mod-el 638*) with oxygen-enriched air at 60 cpm and current volume of 1 ml/100 g. Respiratory rate and current volume were adjusted to keep pH and arterial blood gases within physiological limits. Anesthesia was maintained by an additional bolus of pentobarbital (2 mg/100 g) when necessary. To compensate for perioperative fluid loss, the jugular vein was catheterized using a binocular surgical microscope (*Wild M651.MS-D, Leica; Herbrugg, Switzerland*), and continuous perfusion of saline solution (0.9% NaCl) was initiated. The heart was exposed by means of a median sternotomy and the pericardium was opened out completely; the pulmonary trunk was dissected and ligated with 1 silk to achieve constriction of the vessel during the PrOv protocol. RV and LV pressures were measured using 2F high-fidelity micromanometers (*Millar Instruments SPR-324*) inserted into the free wall of the RV and the apex of the LV respectively.

After the prepared animals were stabilized (~15 min), the experimental protocols were begun. The hemodynamic data were acquired during suspended respiration at end-expiration. Analog-to-digital conversion was performed at 1 kHz. The following parameters of RV and LV function were recorded: end-diastolic pressure (RVPEd and LVPEd; mmHg); maximum systolic pressure (RVP_{max} and LVP_{max}; mmHg).

Quantification of mRNA

Total mRNA (mRNA_{total}) was extracted using the guanidine-thiocyanate method and loaded onto a silica gel membrane in accordance with the manufacturer's instructions (*Qiagen 74124*). The purity and concentration of the mRNA_{total} were determined spectrophotometrically (*Eppendorf 613000.012*).

The relative quantification of specific mRNA was carried out by two-step real-time RT-PCR. Reverse transcription (10 minutes at 22 °C, 50 minutes at 50 °C and 10 minutes at 95 °C; total volume: 20 µL) was performed in a standard thermocycler (*Whatman Biometra 050-901*): 40 U reverse transcriptase (*Invitrogen 18064-014*); 20 U ribonuclease inhibitor (*Promega N2515*); 30 ng/ml random primers (*Invitrogen 481990-011*); 0.5 nM nucleotides (*MBI Fermentas R0192*); 1.9 mM MgCl₂ and 10 mM DTT. Ten percent of the product of reverse transcription was used in the PCR (*LightCycler, Roche*), using the fluorochrome SYBR Green (*Qiagen*

50°C e 10 min a 95°C; volume final 20 µl) foi efectuada num termociclador convencional (*Whatman Biometra 050-901*): 40 U/reacção de transcriptase reversa (*Invitrogen 18064-014*), 20 U/reacção de inibidor da RNase (*Promega N2515*), 30 ng/ml de *random primers* (*Invitrogen 481990-011*), 0,5 nM de nucleótidos (*MBI Fermentas R0192*), 1,9 mM MgCl₂ e 10 mM de DTT. Dez por cento do produto da transcrição reversa foi utilizado na reacção de PCR (*Light-Cycler, Roche*), utilizando o fluorocromo *SYBR Green* (*Qiagen 204143*) de acordo com as instruções do fabricante. Os pares de *primers* para os genes estudados foram os seguintes: IL-6: *fw*- CCGTTTCTACCTGGAGTTTG e *rev*- GAAGTTGGGG TAGGAAGGAC; TNF-α: *fw*- GGGGCTCCAGAACTCCA e *rev*- TGGGCTACGG GCTTGCA; GAPDH: *fw*- TGGCCTCCGTGTTCCCTACCC e *rev*- CCGCCTGCTTC ACCACCTTCT. A formação de dímeros de *primers* e a pureza do produto de amplificação foram avaliadas através da análise das *melting curves* dos PCR em tempo real e dos géis de agarose-2% (brometo de etídeo, 0,5 µg/ml). Para cada molécula de ARNm estudada, foram elaboradas curvas padrão a partir da correlação entre a quantidade inicial de ARNm_{total} e ciclo PCR limiar (método da segunda derivada) de diluições crescentes de uma amostra aleatória de miocárdio de rato ($r > 0,97$). A quantificação relativa dos ARNm específicos foi obtida através da regressão do ciclo PCR limiar do produto da transcrição reversa da amostra (50 ng de ARNm_{total}). A expressão de GAPDH não variou significativamente entre os grupos experimentais, tendo este gene sido utilizado como controlo interno. Os resultados são expressos em unidades arbitrárias (UA), definidas como a média dos valores do grupo *Sham* (*Sham* = 1 UA), após normalização para o GAPDH.

Análise Estatística

Os resultados são apresentados como médias ± erro padrão. Os dados hemodinâmicos são comparados utilizando o teste *two-way ANOVA* para medições repetidas. As diferenças da expressão do ARNm entre os grupos experimentais foram analisadas através do *one-way ANOVA* (para os dados com distribuição normal) ou pelo teste não paramétrico correspondente (*Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks*). Foram utilizados a regressão linear e os coeficientes de correlação de Pearson para correlacionar variáveis.

204143) in accordance with the manufacturer's instructions. The primer pairs for the genes under study were as follows: IL-6: *fw*- CCGTTTCTACCTGGAGTTTG and *rev*- GAAGTTGGGG TAGGAAGGAC; TNF-α: *fw*- GGGGCTCCAGAACTCCA and *rev*- TGGGCTACGG GCTTGCA; GAPDH: *fw*- TGGCCTCCGTGTTCCCTACCC and *rev*- CCGCCTGCTTC ACCACCTTCT. The formation of primer dimers and the purity of the amplification product were tested by melting curve analysis of the PCR product and of 2% agarose gel (0.5 µg/ml ethidium bromide). For each mRNA molecule studied, standard curves were drawn based on the correlation between the initial quantity of mRNA_{total} and the threshold PCR cycle (second derivative method) from successive dilutions of a random sample of rat myocardium ($r > 0.97$). The relative quantification of specific mRNA was obtained by regression of the threshold PCR cycle of the reverse transcription product of the sample (50 ng of mRNA_{total}). GAPDH expression did not vary significantly between the experimental groups and so this gene was used as an internal control. The results are expressed in arbitrary units (AU), defined as the mean of values in the Sham group (*Sham* = 1 AU), after normalization for GAPDH.

Statistical analysis

The results are presented as means ± standard error. The hemodynamic data are compared using two-way ANOVA for repeated measurements. Differences in mRNA expression between the experimental groups were analyzed by one-way ANOVA for data with a normal distribution or the corresponding non-parametric test (Kruskal-Wallis rank ANOVA). Linear regression and Pearson's correlation coefficient were used to correlate the variables. When necessary, the test was preceded by logarithmic transformation to obtain a normal distribution. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Hemodynamic parameters

The hemodynamic data are presented in *Fig. 1*. Pulmonary trunk banding and dextran infusion induced different hemodynamic profiles. In the banding group (PrOv), selective RV overload was observed without significant hemodynamic alterations in the LV, while RV end-diastolic pressures rose significantly at 240 and 300 minutes.

Quando necessário, o teste foi precedido por uma transformação logarítmica para a obtenção de uma distribuição normal. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Parâmetros Hemodinâmicos

Os dados hemodinâmicos são apresentados na Fig. 1.

O *banding* pulmonar e a perfusão de dextrano induziram perfis hemodinâmicos distintos. No grupo submetido a *banding* pulmonar (SPr) observou-se a sobrecarga selectiva do VD, sem alterações hemodinâmicas significativas no VE. As

Acute intravascular volume expansion following dextran infusion in the VolOv group led to progressive rises in end-diastolic pressures in both RV and LV, while systolic pressures rose only in the RV.

In the Sham group, the hemodynamic parameters analyzed remained stable throughout the experimental protocol.

Heart rate was similar in all the study groups (298 ± 8.9 bpm) and did not vary during the experimental protocols. Hemodynamic data in the animals sacrificed at 120 min were similar to those sacrificed at 360 min.

Biventricular expression of TNF- α and IL-6 in acute cardiac overload

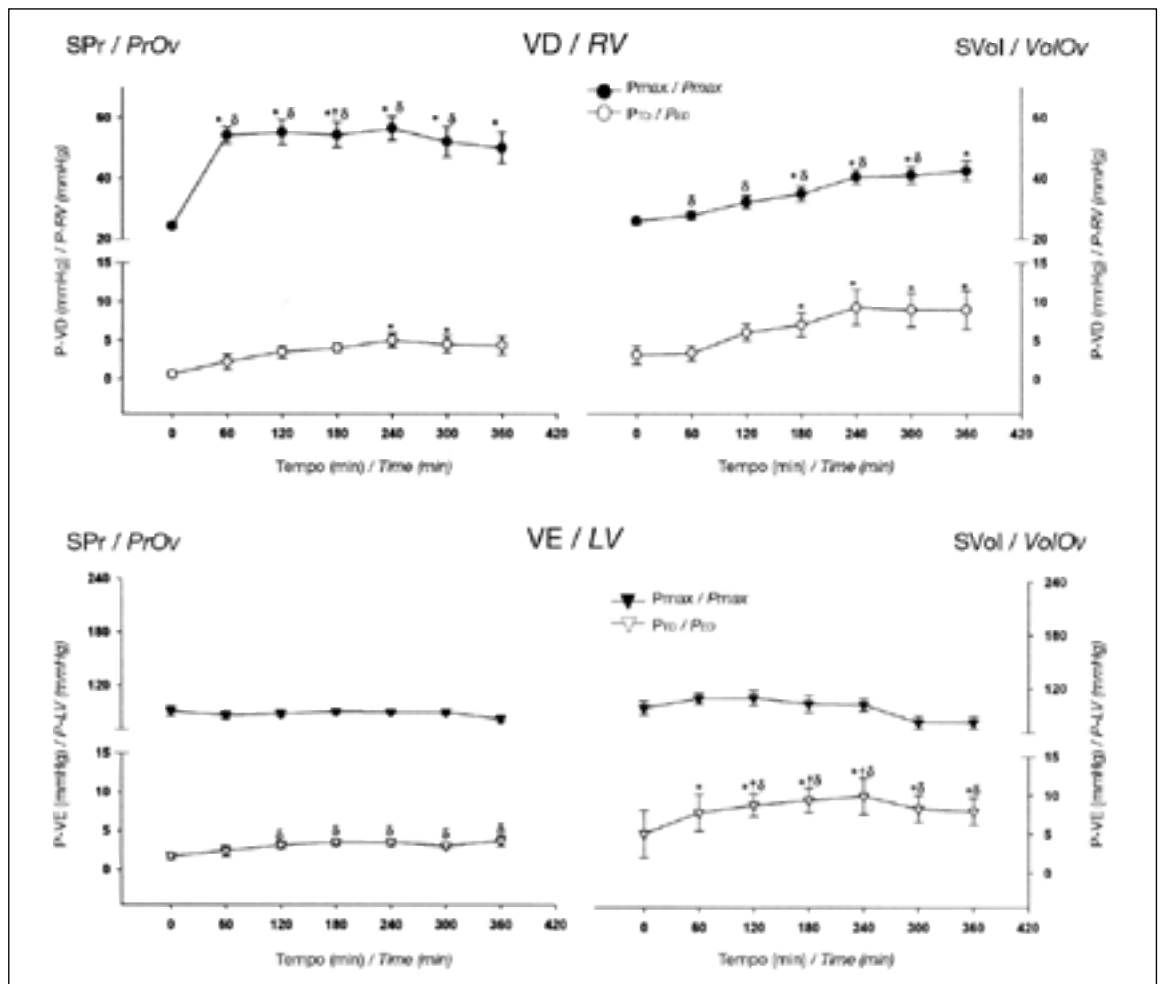


Fig. 1 Hemodinâmica biventricular durante a sobrecarga aguda de volume (SVol; painéis da direita) e de pressão do VD (SPr; painéis da esquerda). Os parâmetros hemodinâmicos, pressão máxima (P_{max} , a negro) e pressão telediastólica (P_m , a branco) foram obtidos através da inserção de micromanómetros de alta fidelidade no VD (quadrados; painéis superiores) e no VE (triângulos invertidos; painéis inferiores). * $P < 0,05$ vs. 0 min; † $P < 0,05$ vs. Sham; ‡ $P < 0,05$ vs. SPr/Svol.

Fig. 1 Biventricular hemodynamics during acute RV volume (VolOv; right) and pressure overload (PrOv; left). The hemodynamic parameters – maximum pressure (P_{max} ; black) and end-diastolic pressure (P_{ED} ; white) – were obtained by inserting high-fidelity micromanometers into the RV (squares; top) and the LV (inverted triangles; bottom).

* $p < 0.05$ vs. 0 min; † $p < 0.05$ vs. Sham; ‡ $p < 0.05$ vs. PrOv/VolOv.

pressões VD telediastólicas, por sua vez, aumentaram significativamente aos 240 e 300 minutos.

A expansão aguda do volume intravascular com dextrano (SVol) elevou progressivamente as pressões telediastólicas, tanto do VD como do VE, enquanto que as pressões sistólicas aumentaram apenas no VD.

No grupo *Sham*, os parâmetros hemodinâmicos analisados permaneceram estáveis durante todo o protocolo experimental.

A frequência cardíaca foi semelhante em todos os grupos estudados ($298 \pm 8,9$ bpm), não tendo variado durante os protocolos experimentais. Os dados hemodinâmicos dos animais eutanasiados aos 120 min foram semelhantes aos seus correspondentes eutanasiados aos 360 min.

Expressão biventricular de TNF- α

In the PrOv and VoOv groups, TNF- α and IL-6 mRNA levels were higher than in the Sham group in the overloaded ventricles (*Fig. 2*). Volume overload induced greater gene activation for both genes than pressure overload. However, there were differences in gene expression: it was increased for TNF- α but not for IL-6 in the non-overloaded LV in the PrOv group. No correlation was in fact found between levels of TNF- α and IL-6 expression in the LV, while in the RV this difference reached statistical significance (*Fig. 3*).

DISCUSSION

Acute cardiac overload induces overexpression of pro-inflammatory cytokines in the myocardium, more so in volume overload than in pressure overload. However, gene expression of TNF- α and IL-6 is not uniform,

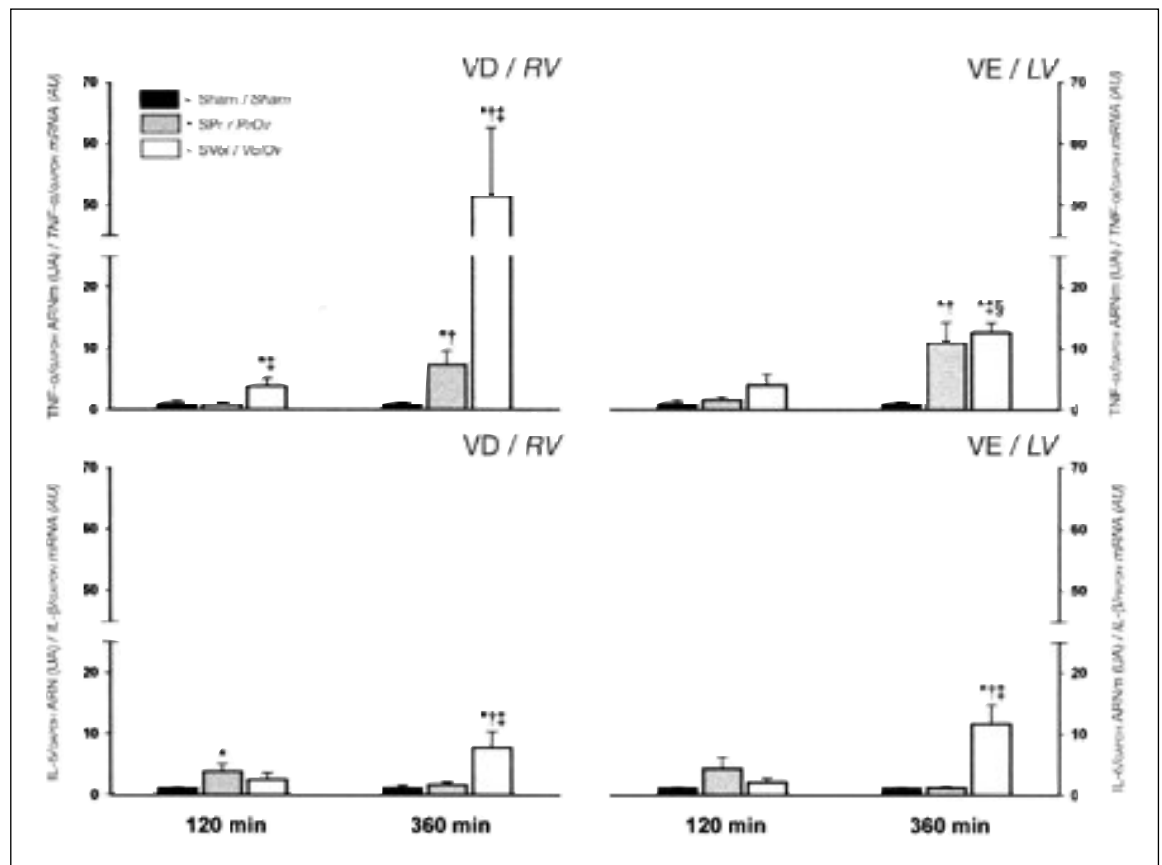


Fig. 2 Expressão biventricular das citocinas pró-inflamatórias na sobrecarga aguda de volume (SVol; cinzento) e de pressão do VD (SP; branco) e no grupo Sham (negro). A expressão miocárdica de TNF- α (painéis superiores) e IL-6 (painéis inferiores) foi estudada aos 120 (grupo de colunas da esquerda) e 360 (grupo de colunas da direita) min, no VD (painéis da esquerda) e no VE (painéis da direita).
 * $P < 0,05$ vs. Sham; † $P < 0,05$ vs. 120 min; ‡ $P < 0,05$ vs. SP; § $P < 0,05$ vs. VD.

Fig. 2 Biventricular expression of pro-inflammatory cytokines in acute RV volume (VoOv; gray) and pressure (PrOv; white) overload and in the Sham group (black). Myocardial expression of TNF- α (top) and IL-6 (bottom) was studied at 120 (left bars) and 360 (right bars) min, in the RV (left) and LV (right).
 * $p < 0.05$ vs. Sham; † $p < 0.05$ vs. 120 min; ‡ $p < 0.05$ vs. PrOv; § $p < 0.05$ vs. RV.

e IL-6 na sobrecarga cardíaca aguda

Nos grupos SPr e SVol os níveis de ARNm do TNF- α e IL-6 foram superiores aos do grupo Sham nos ventrículos sobrecarregados (Fig. 2). Para os dois genes, a sobrecarga de volume induziu uma maior activação génica que a sobrecarga de pressão. No entanto, foram observadas diferenças no perfil de expressão génica do TNF- α e da IL-6, com uma elevação do TNF- α , mas não da IL-6, no VE não sobrecarregado do grupo SPr. De facto, não se verificou correlação entre os níveis de expressão do TNF- α e da IL-6 no VE, enquanto que no VD a correlação atingiu significado estatístico (Fig. 3).

DISCUSSÃO

A sobrecarga cardíaca aguda induz sobreexpressão das citocinas pró-inflamatórias no miocárdio, superior na sobrecarga de volume do que na sobrecarga de pressão. A activação génica do TNF- α e do IL-6 não é, no entanto, uniforme, envolvendo mecanismos dependentes e independentes da carga.

A expansão aguda do volume intravascular induziu um aumento progressivo das pressões telediastólicas em ambos os ventrículos, enquanto que a elevação das pressões sistólicas se restringiu ao VD. Este perfil hemodinâmico, já previamente descrito num modelo animal de

and involves both load-dependent and load-independent mechanisms.

Acute intravascular volume overload induces a progressive rise in end-diastolic pressure in both ventricles, while increased systolic pressure is only found in the RV. This hemodynamic profile, previously described in an animal model of volume overload induced by aortocaval fistula⁽¹¹⁾, reflects different types of overload in the two ventricles: pressure and volume overload in the RV, and volume overload in the LV. In the case of pulmonary trunk banding, RV pressure overload was accompanied by a rise in RVP_{ED} at the end of the experimental protocol but no significant alterations in LV hemodynamics.

Gene expression of TNF- α and IL-6 was higher in acute volume overload. Previous studies have implicated these two cytokines in eccentric hypertrophy, and transgenic mice with over-expression of TNF- α present a dilated cardiomyopathy phenotype⁽⁶⁾, while activation of the receptor transmembrane domain of IL-6, gp130, induces longitudinal sarcomere growth in isolated rat cardiomyocytes⁽¹²⁾.

Increased TNF- α mRNA levels were seen in the LV, which was not overloaded, as well as in the overloaded ventricles of the animals subjected to pulmonary trunk banding. Gene expression of TNF- α in non-overloaded

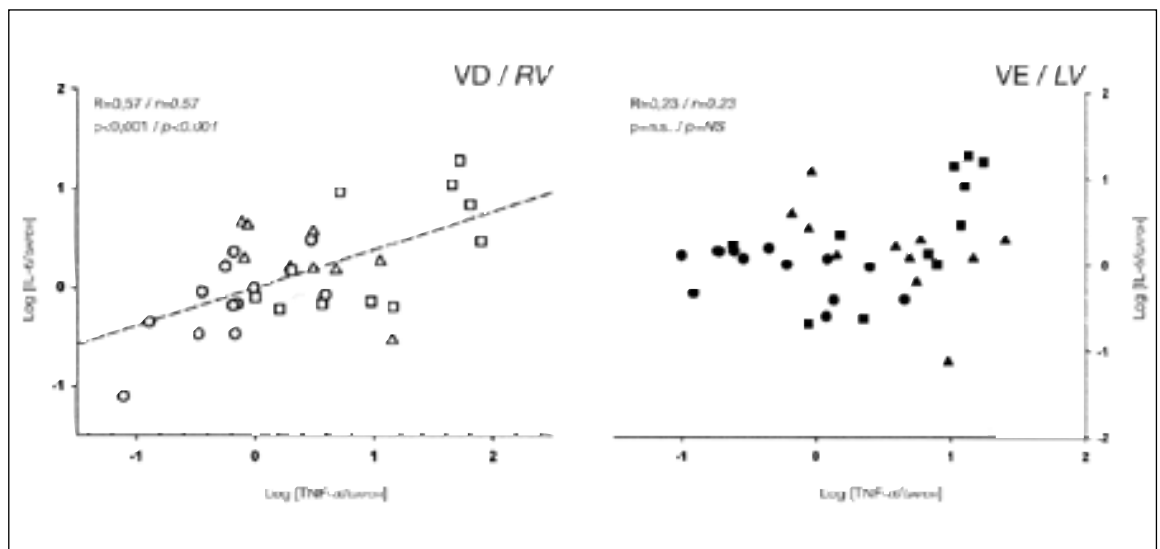


Fig. 3 Correlação entre os níveis de expressão do TNF- α e da IL-6 na sobrecarga aguda de volume (SVol; quadrados) e de pressão do VD (SPr; triângulos) e no grupo Sham (círculos). No VD (painel da esquerda; branco) observou-se uma correlação positiva entre os níveis destas duas citocinas pró-inflamatórias ($r=0,57$; $P<0,001$), enquanto que no VE (painel da direita; negro) esta correlação não atinge significado estatístico ($r=0,23$; $P=0,192$).

Fig. 3 Correlation between levels of TNF- α and IL-6 expression in acute RV volume (VolOv; squares) and pressure (PrOv; triangles) overload and in the Sham group (circles). In the RV (left; white), a positive correlation can be seen between the levels of the two cyto-

sobrecarga de volume por fístula aorto-cava⁽¹¹⁾, traduz diferentes tipos de sobrecarga nos dois ventrículos: sobrecarga de pressão e de volume no VD, e sobrecarga de volume no VE. No que concerne ao *banding* do tronco pulmonar, a sobrecarga de pressão VD acompanhou-se de uma elevação das VD-PTD no final do protocolo experimental, sem alterações significativas da hemodinâmica VE.

A activação génica da IL-6 e do TNF- α foi superior na sobrecarga aguda de volume. Estudos anteriores implicaram estas duas citocinas na hipertrofia excêntrica. De facto, ratinhos transgénicos com sobreexpressão de TNF- α apresentam o fenótipo de cardiomiopatia dilatada⁽⁶⁾, enquanto que a activação do domínio do receptor transmembranar da IL-6, a gp130, induz o crescimento longitudinal do sarcómero nos cardiomiócitos isolados de rato⁽¹²⁾.

O aumento dos níveis de ARNm do TNF- α foi observado não só nos ventrículos em sobrecarga, mas também no VE, não sobrecarregado, dos animais submetidos a *banding* do tronco pulmonar. A activação génica do TNF- α no miocárdio não-sobrecarregado envolve provavelmente mediação parácrina ou endócrina. De facto, o aumento da expressão de TNF- α no miocárdio isquémico induz a expressão de citocinas no miocárdio adjacente⁽¹³⁾ e a linfa cardíaca pós-isquémica activa a expressão de citocinas nas células mononucleares em cultura, sendo que este efeito é perdido após incubação com anticorpo anti-TNF- α ⁽¹⁴⁾. Adicionalmente, a transplantação heterotópica de corações no pós-enfarte activa a expressão de TNF- α no coração normal dos ratos receptores⁽¹⁵⁾. Diversamente, a sobreexpressão da IL-6 restringiu-se aos ventrículos em sobrecarga, o que poderá explicar a ausência de correlação entre os níveis de TNF- α e de IL-6 no VE. A dissociação da expressão destes dois genes tinha já sido observada em modelos de sobrecarga crónica de volume, nos quais o aumento da expressão de IL-6 não se acompanha de elevação dos níveis de ARNm do TNF- α ⁽¹⁶⁾.

As alterações do perfil de expressão génica do miocárdio têm sido implicadas na fisiopatologia da progressão da IC^(17, 18). De facto, níveis das citocinas pró-inflamatórias associam-se a um risco aumentado de progressão

myocardium probably involves paracrine or endocrine mechanisms. Increased TNF- α expression in ischemic myocardium does in fact induce expression of cytokines in adjacent myocardium⁽¹³⁾ and post-ischemic cardiac lymph activates the expression of cytokines in mononuclear cells in culture; this effect disappears after incubation with anti-TNF- α antibodies⁽¹⁴⁾. Furthermore, heterotopic post-infarction heart transplantation activates TNF- α expression in normal hearts of recipient rats⁽¹⁵⁾. By contrast, overexpression of IL-6 is restricted to overloaded ventricles, which may explain the lack of correlation between levels of TNF- α and IL-6 in the LV. Differences in expression of these two genes have been observed in models of chronic volume overload, in which increased IL-6 expression is not accompanied by rises in TNF- α mRNA levels⁽¹⁶⁾.

Changes in the profile of gene expression in the myocardium have been implicated in the pathophysiology of HF progression^(17, 18) and levels of pro-inflammatory cytokines are associated with increased risk for disease progression⁽¹⁹⁾. In this study, we describe changes in expression of pro-inflammatory cytokines in response to acute cardiac overload. Characterization of these early alterations may help in understanding the molecular basis of early ventricular remodeling. The results of the present study suggest that pro-inflammatory cytokines play an important part in acute cardiac overload, particularly volume overload. At the same time, the early activation of innate immunity in response to cardiac overload may help to explain the disappointing results obtained in clinical trials in which this molecular pathway was inhibited in more advanced stages of HF^(20, 21).

Pedidos de separatas para:
Address for reprints:

ADELINO F. LEITE-MOREIRA
Serviço de Fisiologia da Faculdade de Medicina do Porto
Alameda Prof. Hernâni Monteiro,
4200-319 PORTO, PORTUGAL
e-mail: amoreira@med.up.pt

da doença⁽¹⁹⁾. No presente estudo descrevemos alterações na expressão das citocinas pró-inflamatórias em resposta à sobrecarga cardíaca aguda. A caracterização destas alterações precoces poderá contribuir para a compreensão da base molecular da remodelagem ventricular precoce. Neste contexto, os resultados do

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

- 1 Hoshijima M, Chien KR. Mixed signals in heart failure: cancer rules. *J Clin Invest* 2002;109:849-55.
- 2 Sussman MA, McCulloch A, Borg TK. Dance band on the Titanic: biochemical signaling in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2002;91:888-98.
- 3 Morisco C, Sadoshima J, Trimarco B, Arora R, Vatner DE, Vatner SF. Is treating cardiac hypertrophy salutary or detrimental: the two faces of Janus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H1043-7.
- 4 Smith RM, Lecour S, Sack MN. Innate immunity and cardiac preconditioning: a putative intrinsic cardioprotective program. *Cardiovasc Res* 2002;55:474-482.
- 5 Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP, Demetris AJ, Feldman AM. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res* 1997;81: 627-635.
- 6 Sivasubramanian N, Coker ML, Kurrelmeyer KM, MacLellan WR, DeMayo FJ, Spinale FG, Mann DL. Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation* 2001;2001: 826-31.
- 7 Kapadia SR, Oral H, Lee J, Nakano M, Taffet GE, Mann DL. Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor-alpha expression in adult feline myocardium. *Circ Res* 1997;81: 187-195.
- 8 Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest* 1995;96:1042-52.
- 9 Mann DL. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Ann Rev Physiol* 2003;65:81-101.
- 10 Baumgarten G, Knuefermann P, Kalra D, Gao F, Taffet GE, Michael L, Blackshear PJ, Carballo E, Sivasubramanian N, Mann DL. Load-dependent and -independent regulation of proinflammatory cytokine and cytokine receptor gene expression in the adult mammalian heart. *Circulation* 2002;105: 2192-7.
- 11 Modesti PA, Vanni S, Bertolozzi I, Cecioni I, Lumachi C, Perna AM, Boddi M, Gensini GF. Different growth factor activation in the right and left ventricles in experimental volume overload. *Hypertension* 2004;43:101-8.
- 12 Wollert KC, Taga T, Saito M, Narazaki M, Kishimoto T, Glembocki CC, Vernallis AB, Heath JK, Pennica D, Wood WI, Chien KR. Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell hypertrophy. Assembly of sarcomeric units in series VIA gp130/leukemia inhibitory factor receptor-dependent pathways. *J Biol Chem* 1996;271:9535-45.
- 13 Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 2004;94: 1543-53.
- 14 Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002;53:31-47.
- 15 Nakamura H, Umemoto S, Naik G, Moe G, Takata S, Liu P, Matsuzaki M. Induction of left ventricular remodeling and dysfunction in the recipient after donor heart myocardial infarction: new insights into the pathologic role of tumor necrosis factor-alpha from a novel heterotopic transplant-coronary ligation rat model. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:173-81.
- 16 Dai RP, Dheen ST, He BP, Tay SSW. Differential expression of cytokines in the rat heart in response to sustained volume overload. *Eur J Heart Fail* 2004;6:693-703.
- 17 Palmieri EA, Benincasa G, Di Rella F, Casaburi C, Monti MG, De Simone G, Chiariotti L, Palombini L, Bruni CB, Sacca L, Cittadini A. Differential expression of TNF-alpha, IL-6 and IGF-1 by graded mechanical stress in normal rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282: H926-34.
- 18 van Wamel AJ, Ruwhof C, van der Valk-Kokshoorn LJ, Schrier PI, van der Laarse A. Rapid effects of stretched myocardial and vascular cells on gene expression of neonatal rat cardiomyocytes with emphasis on autocrine and paracrine mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 2000;381:67-73.
- 19 Vasan RS, Sullivan LM, Roubenoff R, Dinarello CA, Harris T, Benjamin EJ, Sawyer DB, Levy D, Wilson PW, D'Agostino RB. Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2003;107:1486-91.
- 20 Gullestad L, Aukrust P. Review of trials in chronic heart failure showing broad-spectrum anti-inflammatory approaches. *Am J Cardiol* 2005;95:17C-23C.
- 21 Mann DL, McMurray JJ, Packer M, Swedberg K, Borer JS, Colucci WS, Djian J, Drexler H, Feldman A, Kober L, Krum H, Liu P, Nieminen M, Tavazzi L, van Veldhuisen DJ, Waldenström A, Warren M, Westheim A, Zannad F, Fleming T. Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the Randomized Etanercept