



5º Congresso de Pós-Graduação

GERAÇÃO DA INTERLEUCINA-6 NOS AJUSTES METABÓLICOS DESENCADEADOS NA FASE INICIAL DA IMOBILIZAÇÃO ARTICULAR: ESTUDO EM RATOS.

Autor(es)

Orientador(es)

Eliete Luciano

Evento

A homeostasia metabólica das fibras musculares depende de um constante suprimento de substratos metabolizáveis ajustando constantemente à disponibilidade a demanda. Neste sentido, as dinâmicas que determinam o padrão funcional podem ser comprometidas por diferentes fatores, como por exemplo, bloqueio da junção neuromuscular, desnervação ou ainda pelo desuso induzido pela imobilização (KANNUS et al., 1998). Concomitante ao desuso muscular crônico, observa-se a instalação de resistência à insulina potencializando o estado catabólico, geração de fibrose intramuscular, redução da extensibilidade muscular além de limitação da liberdade de movimento articular (PLOUG et al., 1987; REARDON et al., 2001). Apesar do desuso muscular crônico e da imobilização ser condições que modificam o perfil metabólico, as dinâmicas ativadas por este mecanismo ainda não são totalmente conhecidas, porém, há indícios que as alterações mais relevantes da atrofia possam ocorrer nos dias iniciais da imobilização (QUIN et al., 1997; HIROSE et al., 2000). Alguns estudos têm tentado elucidar as alterações metabólicas presentes na imobilização. Hilder et al., (2003), estudaram o método de imobilização através da suspensão de membros posteriores de ratos e demonstraram que em músculos esqueléticos de contração lenta, como o músculo sóleo, a resistência à insulina acompanha o processo de atrofia muscular induzida pelo desuso. Simultaneamente, esses autores observaram também uma redução na expressão de proteínas nos músculos hipotrofiados e a correlacionaram à redução na efetividade da proteína IRS-1, evidenciando o comprometimento na sinalização insulínica. Além disso, observaram também uma redução na atividade da enzima Akt, indicando alterações nas vias citosólicas responsáveis pela glicogênese bem como a lipólise e a glicólise, fato que reflete no processo de hipotrofia. Outro fator que possivelmente possa estar ligado ao desuso é a formação de citocinas, que são proteínas de baixo peso molecular, as quais atuam de forma autócrina, parácrina e endócrina modulando várias funções celulares. Dentre as citocinas a interleucina 6 (IL-6) merece destaque devido à sua atividade pró e inflamatória (MALDOVEANU, SHEPHARD, SHEK, 2001; JAWA et al., 2006). A IL-6 está entre os mediadores mais potentes da resposta aguda ao trauma, participando de uma cascata de reações que inicia com o dano tecidual e que objetiva, em última instância, a restauração do tecido (CRANE, MILLER, 1983). Estudos que focalizaram fenômenos ocorrentes em situações catabólicas, evidenciaram elevação na concentração plasmática de IL-6 (SEHGAL, 1990). Nos

músculos esqueléticos, a IL-6 tem sido relacionada com a proteólise muscular evidenciada clinicamente pela atrofia muscular. Essa participação na proteólise muscular tem sido estudada por diferentes pesquisadores, indicando que a IL-6 também pode interferir no eixo GH/IGF-I (BENEDETTI et al., 1997; LIESKOVSKA, GUO, DERMAN, 2002), comprometendo o equilíbrio metabólico global.

1. Introdução

A homeostasia metabólica das fibras musculares depende de um constante suprimento de substratos metabolizáveis ajustando constantemente à disponibilidade a demanda. Neste sentido, as dinâmicas que determinam o padrão funcional podem ser comprometidas por diferentes fatores, como por exemplo, bloqueio da junção neuromuscular, desnervação ou ainda pelo desuso induzido pela imobilização (KANNUS et al., 1998). Concomitante ao desuso muscular crônico, observa-se a instalação de resistência à insulina potencializando o estado catabólico, geração de fibrose intramuscular, redução da extensibilidade muscular além de limitação da liberdade de movimento articular (PLOUG et al., 1987; REARDON et al., 2001). Apesar do desuso muscular crônico e da imobilização ser condições que modificam o perfil metabólico, as dinâmicas ativadas por este mecanismo ainda não são totalmente conhecidas, porém, há indícios que as alterações mais relevantes da atrofia possam ocorrer nos dias iniciais da imobilização (QUIN et al., 1997; HIROSE et al., 2000). Alguns estudos têm tentado elucidar as alterações metabólicas presentes na imobilização. Hilder et al., (2003), estudaram o método de imobilização através da suspensão de membros posteriores de ratos e demonstraram que em músculos esqueléticos de contração lenta, como o músculo sóleo, a resistência à insulina acompanha o processo de atrofia muscular induzida pelo desuso. Simultaneamente, esses autores observaram também uma redução na expressão de proteínas nos músculos hipotrofiados e a correlacionaram à redução na efetividade da proteína IRS-1, evidenciando o comprometimento na sinalização insulínica. Além disso, observaram também uma redução na atividade da enzima Akt, indicando alterações nas vias citosólicas responsáveis pela glicogênese bem como a lipólise e a glicólise, fato que reflete no processo de hipotrofia. Outro fator que possivelmente possa estar ligado ao desuso é a formação de citocinas, que são proteínas de baixo peso molecular, as quais atuam de forma autócrina, parácrina e endócrina modulando várias funções celulares. Dentre as citocinas a interleucina 6 (IL-6) merece destaque devido à sua atividade pró e inflamatória (MALDOVEANU, SHEPHARD, SHEK, 2001; JAWA et al., 2006). A IL-6 está entre os mediadores mais potentes da resposta aguda ao trauma, participando de uma cascata de reações que inicia com o dano tecidual e que objetiva, em última instância, a restauração do tecido (CRANE, MILLER, 1983). Estudos que focalizaram fenômenos ocorrentes em situações catabólicas, evidenciaram elevação na concentração plasmática de IL-6 (SEHGAL, 1990). Nos músculos esqueléticos, a IL-6 tem sido relacionada com a proteólise muscular evidenciada clinicamente pela atrofia muscular. Essa participação na proteólise muscular tem sido estudada por diferentes pesquisadores, indicando que a IL-6 também pode interferir no eixo GH/IGF-I (BENEDETTI et al., 1997; LIESKOVSKA, GUO, DERMAN, 2002), comprometendo o equilíbrio metabólico global.

2. Objetivos

O objetivo desse trabalho foi avaliar a concentração plasmática de interleucina 6, o conteúdo de glicogênio dos músculos sóleo e gastrocnêmio porção branca e a concentração plasmática de ácidos graxos livres em ratos submetidos à imobilização articular de membro posterior na posição do tornozelo em 90º, dando ênfase aos primeiros três dias do desuso.

3. Desenvolvimento

Foram utilizados ratos albinos Wistar com 3 meses de idade, fornecidos pelo Biotério da UNESP – Rio Claro, sendo alimentados com ração (Purina® para roedores) e água ad libitum, distribuídos em 4 grupos experimentais com n=6, a saber: controle (C) e imobilizados 1 dia (I1), imobilizados 2 dias (I2) e imobilizados 3 dias (I3). Após anestesia com pentobarbital sódico (50mg/kg,i.p), a pata posterior esquerda dos animais foi

imobilizada com o modelo de órtese de resina acrílica proposto por Silva et al. (2006). Após o período de imobilização os animais foram novamente anestesiados e duas amostras de sangue foram coletadas da veia renal, sendo uma amostra direcionada a extração do soro para avaliação da concentração plasmática de interleucina 6 pelo método ELISA (Kit R&D Systems, Minneapolis, MN, concentração mínima detectável 1,0 pg/ml) e a outra amostra centrifugada para determinação da concentração plasmática de ácidos graxos livres segundo a proposta de REGOUW (1972). A seguir, os músculos sóleo e o gastrocnêmio porção branca, foram retirados para avaliação das reservas glicogênicas pelo método proposto por Siu, Russeau e Taylor (1970). Na avaliação estatística foi aplicado o teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) seguido da análise variância (ANOVA) e teste de Tukey, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

Inicialmente foi avaliado o comportamento das reservas glicogênicas do músculo sóleo (fibra tipo I) sendo observado que nas primeiras 24 horas de desuso, não houve diferença entre os grupos controle (SC) e imobilizado (I1S), estando representado pelas seguintes médias \pm erro padrão da média (SC: $0,50 \pm 0,01$; I1S: $0,47 \pm 0,01$ mg/100mg). Por outro lado, houve diminuição significativa ($P < 0,05$) nas reservas glicogênicas no segundo e no terceiro dia da imobilização, sendo 40% e 60% respectivamente menores quando comparado ao grupo controle (SC: $0,50 \pm 0,01$; I2S: $0,30 \pm 0,006$; I3S: $0,20 \pm 0,006$). Interessantemente, a redução na reserva glicogênica do músculo gastrocnêmio branco (fibra tipo II) foi significativa ($P < 0,05$) desde o primeiro dia da imobilização quando comparado ao músculo dos animais controles, sendo progressivamente 20%, 33% e 56% menores respectivamente entre os 3 primeiros dias da imobilização (CGB: $0,55 \pm 0,01$; I1GB: $0,44 \pm 0,00801$; I2GB: $0,37 \pm 0,01$; I3GB: $0,24 \pm 0,03$ mg/100mg). Cerca de 70 a 85% da glicose captada é direcionada a formação de reservatórios de glicogênio ou pode ainda ser oxidada para geração de energia (HENRIKSEN et al., 1990). HIROSE et al. (2000) estudando ratos que tiveram a pata imobilizada por fixação do joelho e tornozelo a 90°, verificaram redução na transdução do sinal insulínico, sugerindo déficit na ativação do receptor e nas enzimas ativadas a partir deste, incluindo a fosforilação do IRS-1 e a ativação da PI3-K. Além das alterações na transdução do sinal intracelular, Ploug et al. (1995) estudando o comportamento metabólico de músculos vermelhos submetidos a um curto período de imobilização (48 horas) já haviam descrito a redução significativa na população dos transportadores GLUT1 e GLUT4 além da redução na atividade das vias glicogênicas, sugerindo o desenvolvimento do quadro de resistência no desuso. No músculo gastrocnêmio porção branca, houve a maior redução no conteúdo se comparado ao sóleo. Neste sentido, há de se considerar que a órtese permitia a descarga de peso no membro imobilizado e este fato pode ter contribuído para a diferenciação do efeito se comparar ao músculo sóleo, uma vez que este é um músculo postural. Assim, nossos dados corroboram com a literatura referendando que a órtese aqui utilizada como modelo de imobilização mostrou ser um modelo gerador de resistência à insulina comprometendo a homeostasia das vias metabólicas das fibras musculares. Ao avaliar a concentração plasmática de interleucina-6 observamos uma elevação expressiva e significativa nos 3 dias do período de imobilização (I1, I2, I3), sendo 266%, 246% e 247% respectivamente maiores em relação aos valores dos animais controles (C: 259 ± 13 ; I1: 690 ± 59 ; I2: 638 ± 24 ; I3: $642 \pm 7,5$ pg/mL). Nas relações de homeostasia entre os músculos esqueléticos e as citocinas, é sabido que há elevação na produção de citocinas pro-inflamatórias, em especial a IL-6, associado à lesão tecidual, como já observado em atividade física de alta intensidade (KELLER et al., 2001). Neste sentido, nossos resultados revelam essa elevação pode estar associada a diferentes fatores ligados à imobilização como, por exemplo, o desenvolvimento de lesão nas fibras musculares. Considerando estas relações com o perfil metabólico e que a redução na reserva de glicogênio pode comprometer a geração de energia necessária para a atividade contrátil, tem sido descrito a elevação na liberação da IL-6 pelo tecido muscular nestas situações, o que pode justificar nossos resultados onde foi observado elevação na concentração plasmática dessa citocina concomitante à imobilização (GRIMBLE, 2003; RONSEN et al., 2002). Vale salientar que a IL-6 direta ou indiretamente media estados catabólicos (GRIMBLE, 2003). Analisando a concentração plasmática de ácidos graxos livres observamos que houve elevação significativa ($P < 0,05$) também nos 3 dias do período de imobilização, sendo 107%, 31% e 16% respectivamente maiores em relação aos valores encontrados nos animais controles (C: $0,38 \pm 0,01$; I1: $0,79 \pm 0,01$; I2: $0,50 \pm 0,03$; I3: $0,44 \pm 0,01$ mmol/L). Diversos autores estudaram as

relações entre a concentração plasmática de IL-6 e o exercício físico e sugeriram que a elevação pronunciada na concentração plasmática de IL-6 pode estar associada à lipólise (RONSEN et al., 2003; WALLENUS et al., 2002; GERRIT et al., 2003). Neste sentido, observamos que frente à imobilização houve elevação significativa na concentração plasmática de ácidos graxos livres acompanhando a flutuação na concentração plasmática da IL-6, indicando que pode haver integração nas relações funcionais, sugerindo que a IL-6 possa participar do controle de vias metabólicas melhorando a disponibilidade de substratos metabolizáveis (PEDERSEN et al., 2003).

5. Considerações Finais

A fase inicial da imobilização muscular é acompanhada de elevação na produção e secreção de interleucina 6, a qual pode promover a mobilização das reservas energéticas dando suporte nutricional aos processos de reparos teciduais. Assim, temos que destacar que estas respostas fisiológicas são precocemente ativadas enquanto o processo de desuso se instala.

Referências Bibliográficas

BENEDETTI, F.; ALONZI, T.; MORETA, A., et al. Interleukin-6 causes growth impairment in transgenic mice through a decrease in insulin-like growth factor-I. *J Clin Invest.*, v.99, p.643-650, 1997. CRANE, L.J.; MILLER, D.L. Plasma protein induction by isolated hepatocytes. *Mol Cell Biochem.*, v. 53, p.89-109, 1983. GERRIT, V.; STEENBERG, A.; SACCHETTO, M., et al. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J. Clin Endocrinol Metab.*, v.88, n.7, p.3005-3010, 2003. GRIMBLE, R.F. Inflammatory response in the elderly. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v.16, p.21-29, 2003. HENRIKSEN, E.J.; BOURNEY, R.E.; RODNICK, K.J., et al. Glucose transport protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol.*, v.259, n.6, p.593-598, 1990. HIROSE, M.; KANEKI, M.; SUGITA, H., et al. Immobilization depress insulin signaling in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, v.279, n.6, p.1235-1241, 2000. Hilder, T.L.; Tou, J.C.; Grindeland, R.E. et al. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 serine 307 correlates with JNK activity in atrophic skeletal muscle. *FEBS Lett.*, v.553, p.63-67, 2003. JAWA, R.S.; KULAYLAT, M.N.; BAUMANN, H., et al. What is new in cytokine research related to trauma/critical care? *Intensive Care Med.*, v.21, n.2, p.63-85, 2006. KANNUS, P.; JOZSA, L.; JARVINEN, T.L.N., et al. Free mobilization an low to high-intensity exercise in immobilization-induced muscle atrophy. *J. Appl. Physiol.*, v.84, n.4, p.1418-1424, 1998. KELLER, C.; STEENBERG, A.; PILEGAARD, H., et al. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *Faseb J.*, v.15, p.2748-2750, 2001. LIESKOVSKA, J.; GUO, D.; DERMANE, K. IL-6-overexpression brings about growth impairment potentially through a GH receptor defect. *Growth Horm IGF Res.*, v.12, p. 388-398, 2002. MALDOVEANU, A.I.; SHEPARD, R.J.; SHEK, P.N. The cytokine response tom physical activity and training. *Sports Med.*, v.3, n.2, p.115-144, 2001. PEDERSEN, B.K.; STEENBERG, A.; FISCHER, C., et al. Searching for the exercise factor: is Il-6 a candidate? *J. Muscle Res Cell Motil.*, v.24, p.113-119, 2003.. PLOUG, T.; GALBO, H.; VINTEN, J., et al. Kinetics of glucose transport in rat muscle: effects of insulin and contractions. *Am. J. Physiol.*, v.253, p.12 - 20, 1987. Ploug, T.; Ohkuwa, T.; Handberg, A., et al. Effect of immobilization on glucose transport and glucose transporter expression in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v.268, p.980-986, 1995. QUIN, L.; APPLELL, H. J.; CHAN, K. M., et al. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, v.78, n.5, p.512-517, 1997. REARDON, K. A.; FRACP, B. S.; DAVIS, J., et al. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor Mynas are up-regulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle & Nerve*, v.24, p.893-899, 2001. REGOUW, B.J. A simplified method for the determination of free fatty acids in plasma. *Pharm Weekbl.*, v.15, n.107, s.50, p.803-809, 1972. RONSEN, O.; LEA, T.; BAHR, R., et al. Enhanced plasma IL-6 and IL-1ra responses to repeated vs. single bouts of prolonged cycling in elite athletes. *J. Appl Physiol.*, v.92, p.2547-2553, 2002. SEHGAL, P.B. Interleukin 6 in infection and cancer. *Proc Soc Exp Biol Med.*, v.195, n.2, p.183-191, 1990. SILVA, C.A.; GUIRRO, R.R.J.; POLACOW, M.L.O., et al. Proposal for rat hindlimb joint immobilization: orthosis with acrylic resin model. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.*, v.39, p.979-985, 2006. SIU, L.O.; RUSSEAU, J.C.; TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in

small tissue samples. *J Appl Physiol.*, v.28, n.2, p.234-236, 1970. WALLENIOUS, V.; WALLENIOUS, K.; AHRÉN, B., et al. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med.*, v.8, p.75-79, 2002.