

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

MARIA HELENA MATTOS PORTER FONSECA

**EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA NA MODULAÇÃO DA
INFLAMAÇÃO CARDIORRENAL APÓS INFARTO DO MIOCÁRDIO EM
RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)**

SÃO PAULO

2020

MARIA HELENA MATTOS PORTER FONSECA

**EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA NA MODULAÇÃO DA
INFLAMAÇÃO CARDIORRENAL APÓS INFARTO DO MIOCÁRDIO EM
RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós- Graduação em
Medicina da Universidade Nove
de Julho para obtenção do título
de Doutor em Ciências da Saúde

Orientadora: Prof^a Dr^a Fernanda
Marciano Consolim-Colombo

SÃO PAULO

2020

Fonseca, Maria Helena Mattos Porter.

Efeitos da estimulação colinérgica na modulação da inflamação cardiorrenal após infarto do miocárdio em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). / Maria Helena Mattos Porter Fonseca. 2020. 90 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2020.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Fernanda Marciano Consolim-Colombo

1. Infarto agudo do miocárdio. 2. Estimulação colinérgica. 3. Inflamação renal. 4. Fisiopatologia.

I. Colombo, Fernanda Marciano Consolim. II. Título



São Paulo 09 de dezembro de 2020

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: MARIA HELENA MATTOS PORTER FONSECA

Titulo da tese: EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA NA MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO CARDIORRENAL APÓS INFARTO DO MIOCÁRDIO EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS.

Presidente: PROFA. DRA. FERNANDA MARCIANO CONSOLIM COLOMBO Fernanda Colombo

Membro: PROFA. DRA. ROSILENE MOTTA ELIAS Rosilene Motta Elias

Membro: PROF. DR. HUMBERTO DELLÉ Humberto Dellé

Membro: PROF. DR. LÚCIO ROBERTO REQUIÃO MOURA Lúcio Roberto Requão Moura

Membro: PROFA. DRA. LUCIANA KASE TANNO Luciana Kase Tanno

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Hilda e Terence (in memoriam), maiores incentivadores da minha carreira antes mesmo dela começar.

Aos meus filhos, Carlos Eduardo e Stella, razão da minha força e determinação.

Ao meu marido, Luis Eduardo, por sempre estar ao meu lado e me apoiar incondicionalmente.

E por fim, dedico a Deus, sem Ele, nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Fernanda Marciano Consolim Colombo por ter me orientado tão sabiamente e ter acreditado na minha capacidade.

Ao Prof. Dr. Humberto Dellê pela sua paciência e orientação nos meus primeiros passos no retorno ao laboratório, que há muito não frequentava.

À minha colega de doutorado Ms. Pamela Nithzi Bricher Choque não só pelo auxílio nos experimentos, mas principalmente pela parceria e amizade que construímos.

Aos professores do programa de pós graduação em medicina da Universidade Nove de Julho – UNINOVE que me ensinaram e orientaram em diversos momentos.

Aos meus primeiros mestres Prof. Dr. Reinaldo Pessôa Martinelli, Prof. Dr. Heonir Rocha (in memoriam), Dra. Alice Setsuko Okumura e Dra. Kilma Mattos (in memoriam) que me iniciaram na vida acadêmica e profissional, meus eternos exemplos.

Ao meu grande amigo Prof. Dr. Sérgio Makabe que sempre me incentivou na carreira acadêmica.

Ao colega de turma Prof. Dr. Lúcio Roberto Requião Moura que iniciou comigo essa grande jornada acadêmica nos tempos de faculdade.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia da Universidade Nove de Julho – UNINOVE.

Aos alunos de iniciação científica: Camila, Daniela, Andressa, Manuella, Bruna e Luiz.

À minha família e aos meus amigos pela compreensão, suporte e paciência nas minhas ausências.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A inflamação renal ocorre precocemente após o IAM e está associada a pior prognóstico cardiovascular. O processo inflamatório é modulado pela atividade do sistema nervoso autônomo, sendo que a via eferente parassimpática tem um papel anti-inflamatório já reconhecido (reflexo colinérgico anti-inflamatório). Estudos prévios demonstraram melhora do perfil anti-inflamatório no coração de ratos normotensos após IAM. Informações sobre o impacto da estimulação colinérgica na inflamação aguda renal após IAM são escassas.

OBJETIVO: Avaliar os efeitos da estimulação vagal, por meio da administração do brometo de piridostigmina (PI), na resposta inflamatória renal e em parâmetros morfofuncionais do coração de ratos SHR (ratos espontaneamente hipertensos) 7 dias após o IAM.

MÉTODOS: Ratos machos SHR foram randomizados em três grupos: SHAM (grupo toracotomia), IM (grupo infartado submetido a ligadura da artéria coronária esquerda) e IM+PI (grupo infartado e tratado com PI na dose de 40mg/Kg/dia, por 7 dias iniciada no dia do IAM). Todos os animais foram submetidos a canulação da artéria femoral esquerda no 5º dia após IAM, e no dia seguinte, foram feitos registros diretos das curvas de pressão arterial para posterior análises de variáveis hemodinâmicas e de variabilidade da frequência cardíaca (VFC) nos domínios do tempo e da frequência. O Ecodopplercardiograma foi realizado no 6º dia para obtenção de parâmetros morfofuncionais cardíacos, e no 7º dia os ratos foram eutanasiados para coleta de tecidos.

RESULTADOS: O grupo IM, quando comparado com ao grupo SHAM, apresentou significativas alterações ($p < 0,001$): menores valores de pressão sistólica e diastólica; maiores diâmetros sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo (VE); disfunção sistólica, caracterizada pela menor fração de ejeção do VE e pelo menor variação fracional da área do VE (FAC); disfunção diastólica, evidenciada pela maior pressão de enchimento ventricular (relação E/A); e desbalanço autonômico, com maior atividade simpática quantificado pela maior relação LF/HF. Não houve diferenças significativas no número de células imunes (macrófagos e linfócitos) entre os grupos IM e SHAM.

O grupo IM mostrou maior ativação de genes pró-inflamatórios (IL1- β e TNF- α) bem como do gene da TGF- β . O grupo infartado tratado com PI apresentou: maior modulação vagal, evidenciada pela VFC tanto no domínio do tempo quanto da frequência, maior sensibilidade do barorreflexo, inferida pelo maior valor do alpha-index, comparado aos dois outros grupos; menores diâmetros sistólico e diastólico do VE e menor relação E/A, com maior FAC, comparado ao grupo IM, indicando redução das alterações morfofuncionais relacionadas ao IAM; aumento a expressão gênica das citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-13), da IL-17A e da quimiocina MCP-1 comparado aos demais grupos; e redução da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias (IL1- β e TNF- α) ($p < 0,05$). Já a TGF- β teve aumento na sua expressão em ambos os grupos infartados sendo mais expressiva no grupo IM ($p < 0,01$).

CONCLUSÃO: Nossos resultados mostraram que a estimulação colinérgica, por meio da administração de PI, foi capaz de reduzir alterações morfofuncionais cardíacas e também reduzir a inflamação no tecido renal após IAM em ratos SHR. Estes resultados apoiam o conceito de que o sistema colinérgico possa ser um possível alvo terapêutico no tratamento das alterações locais e sistêmicas do IAM.

Palavras-chave: Infarto Agudo do Miocárdio; Estimulação colinérgica; Inflamação renal; Fisiopatologia.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Renal inflammation occurs early after AMI with a worst cardiovascular prognosis associated. The inflammatory process is modulated by the activity of the autonomic nervous system, and the parasympathetic efferent pathway has an anti-inflammatory role already recognized (anti-inflammatory cholinergic reflex). Previous studies have demonstrated improvement of the anti-inflammatory profile in the heart of normotensive rats after AMI. Information on the impact of cholinergic stimulation on acute renal inflammation after AMI is scarce. **OBJECTIVE:** Evaluate the effects of vagal stimulation, by administering pyridostigmine bromide (PY), on renal inflammatory response and morphofunctional parameters of the heart of SHR rats (spontaneously hypertensive rats) 7 days after AMI. **METHODS:** SHR male rats were randomized into three groups: SHAM (thoracotomy group), MI (infarcted group submitted to ligation of the left coronary artery) and MI+PY group (infarcted group and treated with PY at a dose of 40mg/Kg/day, for 7 days started on the day of AMI). All animals were submitted to cannulation of the left femoral artery at the 5th of after AMI, and on the next day direct blood pressure curves were made for subsequent analysis of hemodynamic variables and heart rate variability (HRV) in time and frequency domains. The Ecodopplercardiogram was performed on the 6th day to obtain morphofunctional parameters of the heart, and on the 7th day the rats were euthanized for tissue collection. **RESULTS:** The MI group, when compared to the SHAM group, showed significant changes ($p < 0.001$): lower values of systolic and diastolic pressure; larger systolic and diastolic diameters of the left ventricle (LV); systolic dysfunction, characterized by the lower ejection fraction of the LV and the lower fractional variation of the LV area (FAC); diastolic dysfunction, evidenced by higher ventricular filling pressure (E/A ratio); and autonomous unbalance, with higher sympathetic activity quantified by the higher LF/HF ratio. There were no significant differences in the number of immune cells (macrophages and lymphocytes) between the MI and SHAM groups. The

MI group showed higher activation of pro-inflammatory genes (IL1- β and TNF- α) as well as the TGF- β gene. The infarcted group treated with PY showed: higher vagal modulation, evidenced by HRV in both domains of time and frequency, greater sensitivity of the baroreflex, inferred by the higher alpha-index value, compared to the two other groups; smaller systolic and diastolic diameters of the LV and lower E/A ratio, with higher FAC, compared to the MI group, indicating reduction of morphofunctional changes related to AMI; increased genic expression of anti-inflammatory cytokines (IL-10 and IL-13), IL-17A and chemokine MCP-1 compared to the other groups; and reduction of gene expression of pro-inflammatory cytokines (IL1- β and TNF- α) ($p < 0.05$). TGF- β increased expression in both infarcted groups, being more expressive in the IM group ($p < 0.01$).

CONCLUSION: Our results showed that cholinergic stimulation, through the administration of PY, was able to reduce cardiac morphofunctional changes and also reduce inflammation in renal tissue after AMI in SHR rats. These results support the concept that the cholinergic system can be a possible therapeutic target in the treatment of local and systemic changes in AMI.

Keywords: Acute Myocardial Infarction; Cholinergic stimulation; Renal inflammation; Physiopathology.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	8
LISTA DE TABELAS E QUADROS	12
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
1. Introdução.....	17
1.1 Justificativa	33
2. Objetivos	34
2.1 Objetivo Geral.....	34
2.2 Objetivos Secundários	34
3. Metodologia	35
3.1 Animais.....	35
3.2 Sequência experimental.....	35
3.3 Grupos	35
3.4 Sequência dos experimentos.....	36
3.5 Modelo experimental de infarto agudo do miocárdio	37
3.6 Canulação	38
3.7 Medida direta da pressão arterial.....	39
3.8 Análise da variabilidade da frequência cardíaca espectral (VFC).....	40
3.9 Ecodopplercardiograma.....	41
3.10 Eutanásia do animal e coleta de tecidos	43
3.11 Análise histológica do infiltrado celular no tecido renal.....	43
3.12 Avaliação de macrófagos e linfócitos no tecido renal por meio da imuno- histoquímica	44
3.13 PCR em tempo real.....	45
3.14 Análise estatística	46
4. Resultados	47
4.1 Medidas hemodinâmicas	47
4.2 Análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC)	48
4.3 Avaliação Ecocardiográfica.....	49
4.4 Avaliação de macrófagos e linfócitos no tecido renal por meio da imuno- histoquímica	51
4.5 Análise de expressão de mRNA de genes pró-inflamatórios e anti- inflamatórios no rim	54

5. Discussão.....	60
6. Conclusões	75
7. Referências Bibliográficas	76
8. Anexos.....	91

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1: <i>Primers</i> das citocinas usadas.....	45
Tabela 2: Medidas hemodinâmicas dos grupos estudados.....	47
Tabela 3: Análise da variabilidade da frequência cardíaca espectral (VFC) e sensibilidade barorreflexa (alfa-index) dos grupos estudados.....	49
Tabela 4: Parâmetros Ecocardiográficos dos grupos estudados.	50
Tabela 5: Sumário dos Resultados	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Neuro modulação: Reflexo Inflamatório.	28
Figura 2: Interação entre a via anti-inflamatória colinérgica e o sistema retículo endotelial.	29
Figura 3: Circuito neural da inervação eferente e aferente renal.....	31
Figura 4: Descrição dos Grupos Avaliados	36
Figura 5: Sequência dos experimentos.	37
Figura 6: Indução do infarto agudo do miocárdio por ligadura da artéria coronária.	38
Figura 7: Sítio de dissecação para a cateterização da artéria femoral (A) e isolamento da artéria femoral e inserção do cateter (B).	39
Figura 8: Esquema do sistema de registro de Pressão Arterial.....	40
Figura 9: EcoDopplercardiograma de um animal anestesiado.	42
Figura 10: Representação gráfica da média da contagem de Linfócitos T (células CD3 ⁺) em tecido renal.....	51
Figura 11: Imuno-histoquímica para a marcação de Linfócitos CD3 ⁺ em tecido renal	51
Figura 12: Representação gráfica da média da contagem de Linfócitos T CD4 ⁺ em tecido renal.....	52
Figura 13: Imuno-histoquímica para a marcação de Linfócitos CD4 ⁺ em tecido renal	52
Figura 14: Representação gráfica da média da contagem de Macrófagos M1 (células CD68 ⁺) em tecido renal.....	53
Figura 15: Imuno-histoquímica para a marcação de Macrófagos M1 (CD68 ⁺) em tecido renal.....	53
Figura 16: Representação gráfica da média da contagem de Macrófagos M2 (células CD206 ⁺) em tecido renal.	54
Figura 17: Imuno-histoquímica para a marcação de Macrófagos M2 (CD206 ⁺) em tecido renal.....	54
Figura 18: Expressão de mRNA da citocina IL-1 β no tecido renal.	55
Figura 19: Expressão de mRNA da citocina TNF- α no tecido renal.	55

Figura 20: Expressão de mRNA da citocina IL-6 no tecido renal.	56
Figura 21: Expressão de mRNA da citocina IL-17A no tecido renal.....	56
Figura 22: Expressão de mRNA da citocina MCP-1 no tecido renal.	57
Figura 23: Expressão de mRNA da citocina TGF- β no tecido renal.....	57
Figura 24: Expressão de mRNA da citocina IL-13 no tecido renal.	58
Figura 25: Expressão de mRNA da citocina IL-10 no tecido renal.	58

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach - Acetilcolina
ACV - Acidente vascular cerebral
Ag - Antígeno
AGT - Angiotensinogênio
ATP - Adenosina trifosfato
CAA - Célula apresentadora de antígenos
C5a - Fragmento proteico liberado da clivagem da proteína C5 do sistema complemento
CD - *Cluster* de diferenciação
CMH - Complexo maior de histocompatibilidade
DC - Célula dendrítica
DRC - Doença renal crônica
FAC - Variação fracional da área
FC - Frequência cardíaca
Foxp3 - Fator nuclear de transcrição de proteína *Forkhead 3*
HF - Alta frequência (do inglês *High Frequency*)
IC - Insuficiência cardíaca
ICAM - Molécula de adesão celular
IL - Interleucina
IAM - Infarto agudo do miocárdio
LF - Baixa frequência (do inglês *Low Frequency*)
MAC1 - Antígeno de macrófago 1 ou CD11b/CD18
MCP - Receptor da proteína quimiotática de monócitos
M-CSF - Fator estimulador 4 de colônia de macrófago
MEC - Matriz extracelular
MO - Monócito
mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro
nAChR α -7 - Receptor de Acetilcolina α -7 nicotínico
NK - *Natural Killer*
NOD - Receptor de domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos

PA - Pressão arterial
PAF - Fator estimulador de plaquetas
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PI - Brometo de piridostigmina
PMAD - Padrões moleculares associados a danos
PRRs - Receptores de reconhecimento padrão
RAC - Reflexo anti-inflamatório colinérgico
RMSSD - Raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos
RR - Normais adjacentes
ROS - Espécies reativas ao oxigênio
RRV - Variância dos intervalos RR
SDNN - Desvio padrão de todos os intervalos RR
SHR - Ratos espontaneamente hipertensos
SI - Sistema imunológico
SNC - Sistema nervo central
SNS - Sistema nervoso simpático
SRAA - Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TCR - Receptor de células T
TGF - Fator de transformação do crescimento
TLR - Receptores Toll-like
TNF - Fator de necrose tumoral
VARPI - Variância do intervalo de pulso
VD - Ventrículo Direito
VE - Ventrículo esquerdo
WKY - Wistar Kyoto

1. Introdução

Em 2017, 17,8 milhões dos óbitos globais foram atribuídos às doenças cardiovasculares (DCV). Isso representou um incremento de 21,1% na mortalidade em 10 anos. A prevalência estimada de DCV no mesmo ano foi de 485,6 milhões de casos, representando um aumento de 28,5% dos casos, quando comparado aos dados de 2007(1).

A maioria das doenças cardiovasculares pode ser prevenida por meio da abordagem de fatores comportamentais de risco (uso de tabaco, dietas não saudáveis, obesidade, falta de atividade física e uso nocivo do álcool) utilizando estratégias para a população em geral. Para as pessoas com DCV ou com alto risco cardiovascular (devido à presença de um ou mais fatores de risco como hipertensão, diabetes, hiperlipidemia, obesidade ou doença já estabelecida) (2) é fundamental o diagnóstico e tratamento precoce, por meio de serviços de aconselhamento ou manejo adequado de medicamentos. No Brasil, a taxa anual de doenças cardiovasculares chega a 300 mil, de acordo com o Ministério da Saúde, o que corresponde a uma morte a cada dois minutos. Em uma década, de 2004 a 2014, 3,5 milhões de mortes foram provocadas por doenças cardiovasculares. O número corresponde a quase mil mortes por dia. Entre as ocorrências mais comuns estão o acidente vascular cerebral (AVC), com 100 mil casos; seguido pelo infarto do miocárdio (IAM), com 85,9 mil casos. Doenças relacionadas à hipertensão arterial sistêmica (HAS) chegam a 46,8 mil registros e 27,3 mil são de insuficiência cardíaca (IC). Além disso, ainda que menos frequente neste grupo, as mulheres são as principais vítimas de infartos no país e somam 60% dos óbitos pela doença. De acordo com o DATASUS (3), no estado de São Paulo as doenças cardiovasculares foram responsáveis por 87.713 dos óbitos no ano de 2018, sendo 23.109 por IAM.

Doença cardiovascular e Lesão renal – Elo de disfunção

Os portadores de DCV, ou mesmo pacientes com fatores de risco associados ao desenvolvimento das cardiopatias, apresentam grande propensão ao desenvolvimento de lesões renais. Por outro lado, pacientes com

lesão renal, crônica e aguda, podem desenvolver lesões cardíacas e vasculares. Há um importante "crosstalk" entre os órgãos que representa uma complexa comunicação fisiológica entre os sistemas corporais que é primordial ao equilíbrio ideal do organismo. Coração e rins estão estritamente ligados a vários mecanismos dinâmicos e bidirecionais (4).

A prevalência estimada pelos censos da SBN (Sociedade Brasileira de Nefrologia) dos pacientes em diálise vem em aumento progressivo. O número total estimado de pacientes no país em 1 de julho de 2016 foi de 122.825. Este número representa um aumento de 31,5 mil pacientes nos últimos 5 anos (91.314 em 2011). Houve um aumento anual médio no número de pacientes de 6,3% nos últimos anos (5). Dados brasileiros do estudo ELSA-Brasil (Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto) mostraram uma prevalência de DRC de 8,9%. Estima-se, então, que mais de 19 milhões de indivíduos seriam portadores de DRC em seus diferentes estágios de evolução (6, 7). Em países desenvolvidos, o rastreamento estima uma prevalência na população adulta entre 10 e 13% de doença renal crônica. Existe uma necessidade na identificação precoce da enfermidade e isso não se restringe somente ao acesso à terapia renal substitutiva. O adequado diagnóstico precoce e tratamento permite reduzir complicações e mortalidade cardiovasculares, já que essas são a principal causa de um desfecho desfavorável. Há uma relação direta e negativa entre DRC e mortalidade cardiovascular, sendo essa a principal causa de óbito nessa população.

Do ponto de vista fisiopatológico verificou-se uma série de mecanismos, além de alterações hemodinâmicas, que mediam a interação entre doenças cardíacas e doenças renais, como a participação da ativação neuro-humoral (sistema nervoso simpático e sistema renina-angiotensina-aldosterona), disfunção endotelial, mecanismos inflamatórios e estresse oxidativo. A interação é bidirecional, considerando-se que tanto a disfunção aguda quanto a crônica do coração ou rins podem induzir disfunção aguda ou crônica no outro órgão. Nesse contexto, criou-se a ideia de um elo denominado "Síndrome Cardiorrenal". A importância clínica dessa interrelação pode ser demonstrada pelas seguintes observações: pacientes com IC que têm uma taxa de filtração glomerular (TFG) reduzida têm uma mortalidade aumentada, os pacientes com doença renal

crônica (DRC) têm um risco aumentado de ambas as doenças cardiovasculares aterosclerótica e insuficiência cardíaca e a doença cardiovascular é responsável por até 50% das mortes em pacientes com DRC (8).

O termo "Síndrome Cardiorenal" foi aplicado a essas interações, mas a definição e a classificação não foram claras no início. Um relatório de 2004 do "National Heart, Lung, and Blood Institute" definiu a síndrome cardiorenal (SCR) como sendo uma circunstância em que a terapia para aliviar os sintomas congestivos da IC era limitada por um declínio na função renal manifestado por uma redução na TFG. A redução na TFG foi inicialmente pensada em resultar de uma redução no fluxo sanguíneo renal.

No entanto, vários estudos têm demonstrado que as interações cardiorenais ocorrem em ambas as direções e em uma variedade de configurações clínicas (9). Recentemente, Ronco Et al. sugeriram uma classificação mais abrangente da SCR, considerando uma sequência temporal das lesões (10):

- Tipo 1 (aguda) – Rápida piora da função cardíaca (insuficiência cardíaca) levando à lesão renal aguda (anteriormente chamada insuficiência renal aguda);
- Tipo 2 (crônica) – Disfunção cardíaca crônica (por exemplo: IC crônica) causando doença renal crônica (anteriormente chamada insuficiência renal crônica);
- Tipo 3 (aguda) – Redução aguda e primária da função renal (por exemplo: à isquemia renal ou glomerulonefrite) causando disfunção aguda da função cardíaca, que pode ser manifestada por IC;
- Tipo 4 (crônica) – A DRC primária contribuindo para a disfunção cardíaca, que pode ser manifestada por doença coronariana, arritmias e insuficiência cardíaca;
- Tipo 5 (secundário) – Distúrbios sistêmicos agudos ou crônicos (por exemplo, sepse ou diabetes mellitus) que causam disfunção cardíaca e renal, simultaneamente.

No nosso meio, há uma grande incidência da SCR dos tipos 1 e 2. Condições como alta porcentagem de pacientes com hipertensão arterial não controlada, alta incidência de infarto do miocárdio e envelhecimento da população, propiciam o desenvolvimento de disfunção cardíaca. A IC na América Latina possui etiologias variadas tanto comuns a países desenvolvidos quanto a países em desenvolvimento, a prevalência de IC sistólica varia de 64 a 69% e a IC descompensada representa a principal causa de internação hospitalar por DCV (11). Um retrato mais amplo da situação das internações por IC no Brasil pode ser obtido através das análises dos registros do DATASUS, considerando as limitações inerentes de um banco de dados de caráter administrativo. Apenas no ano de 2018 houve aproximadamente 26 mil óbitos por IC no Brasil. Ainda de acordo com os dados do DATASUS em junho de 2020 houve no país 68.129 internações por doenças cardiovasculares. Com o incremento no número de pacientes acometidos por IC, projeta-se também que o número de pacientes com DRC também aumente. A prevalência da DRC moderada a grave (definida como TFG inferior a 60 ml/min por 1,73 m²; TFG normal é maior que 90 ml/min por 1,73 m²) é de aproximadamente 30 a 60 por cento em pacientes com IC (12). Em uma revisão sistemática de 16 estudos de mais de 80.000 pacientes hospitalizados e não hospitalizados com IC, a lesão renal moderada a grave esteve presente em 29% dos pacientes (13). O banco de dados do registro Norte Americano de insuficiência IC aguda (ADHERE) compilou dados sobre mais de 100.000 pacientes com IC que necessitaram de internação hospitalar. Destes, 30% tiveram um diagnóstico de DRC (definida como uma creatinina sérica superior a 2,0 mg/dl) e apenas 9% tinham uma TFG estimada normal (definida como superior a 90 ml/min por 1,73 m²) (14).

Cerca de 20-30% dos pacientes, durante tratamento para IC, desenvolveram aumento na creatinina sérica de mais de 0,3 mg/dl em diferentes estudos. Fatores de risco para essa piora incluem: uma história prévia de diabetes, creatinina acima de 1,5 mg/dl e hipertensão arterial não controlada. O aumento dos níveis séricos de creatinina ocorre geralmente nos primeiros três a cinco dias após a internação (15). Há uma importante relação entre lesão renal e aumento de mortalidade cardiovascular. No registro GRACE, o aumento de 1 mg/dl na creatinina sérica inicial assim como a redução da TFG foram

relacionados a maior risco para óbito intra-hospitalar (16). Além disso, a mortalidade intra-hospitalar após IAM é maior nos pacientes que desenvolvem disfunção renal (17). As equações de estimativa da função renal disponíveis fornecem uma estimativa melhor da TFG do que a creatinina sérica isoladamente, incluindo as variáveis conhecidas que afetam a creatinina sérica independente da TFG (por exemplo, idade, raça e gênero). Entretanto, estas equações requerem que a concentração de creatinina sérica seja estável e, conseqüentemente, o seu uso para estimar a TFG em pacientes que têm uma creatinina sérica em ascensão rápida é limitado. Entre os pacientes com IC que têm uma creatinina sérica elevada e/ou uma TFG estimada reduzida, é importante distinguir entre a doença renal subjacente e a função renal agravada (ou agudizada) devido ao desenvolvimento da SCR. Esta distinção pode ser difícil e alguns pacientes têm ambos, doença renal crônica subjacente e SCR (18).

Vários mecanismos fisiopatológicos relacionados ao desenvolvimento de lesão renal em portadores de disfunção cardíaca vêm sendo elucidados. Os principais mecanismos avaliados incluem adaptações neuro-humorais, redução da perfusão renal, aumento da pressão venosa renal e disfunção ventricular direita (9, 19). Mais recentemente, o interesse foi deslocado para o papel da inflamação no desenvolvimento das lesões renais.

Adaptações neuro-humorais

A função ventricular esquerda prejudicada leva a uma série de desarranjos hemodinâmicos, incluindo: redução do volume sistólico e débito cardíaco reduzido e, conseqüentemente, do enchimento arterial; pressões atriais elevadas e congestão venosa. Esses distúrbios hemodinâmicos desencadeiam uma variedade de adaptações neuro-hormonais compensatórias, incluindo ativação do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), aumento da liberação de vasopressina (hormônio antidiurético) e endotelina-1, que promovem retenção de sal e água e vasoconstrição sistêmica. Essas adaptações superam os efeitos vasodilatadores e natriuréticos dos peptídeos natriuréticos, óxido nítrico, prostaglandinas e bradicinina. As adaptações neuro-humorais podem contribuir para a preservação de perfusão de órgãos vitais (como o cérebro e o coração) por manutenção de

pressão via sistêmica através da vasoconstrição arterial em outras circulações, incluindo a circulação renal. A redução da perfusão renal foi o fenômeno considerado na definição da SCR e inicialmente considerada somente como consequência da redução do débito cardíaco na definição da SCR. Entretanto, vários estudos sugerem que o índice cardíaco reduzido não é o principal responsável pela disfunção renal em pacientes hospitalizados por IC. Outras alterações hemodinâmicas também vêm sendo investigadas, como pressão venosa renal aumentada, dilatação e disfunção do ventrículo direito (19-21).

Inflamação

Não está bem estabelecido o quão precoce os potenciais mecanismos de interação entre disfunção cardíaca e renal são ativados, nem o quanto intervenções farmacológicas podem potencialmente reduzir e/ou abortar esse processo. De forma específica, não há no momento, nenhuma intervenção direcionada a modular a resposta inflamatória, que está potencialmente ativada nessa condição.

O infarto agudo do miocárdio causa uma inflamação estéril, caracterizada pela ativação do sistema imune inato e pelo recrutamento de células do sistema imune no miocárdio (22). A inflamação aguda pode se desenvolver em minutos a horas e durar por dias. A inflamação crônica ocorre se a lesão tecidual se perpetuar e não for resolvida (23). A resposta inflamatória faz parte da resposta imune inata, essa resposta é desencadeada tanto através da infecção quanto em resposta ao dano tecidual. Esse modelo de imunidade, em que o sistema imune inato responde aos estímulos endógenos que causam lesão é descrito desde 2002 como “Danger Model” (24). Os DAMPs (padrões moleculares associados ao dano) são produzidos em situações em que há lesão celular não provocada apenas por infecção como também por isquemia e outros tipos danos (25). Os receptores do tipo Toll-like (TLR) descritos pela primeira vez em 1997 por Medzhitov e cols (26) estão envolvidos na resposta a moléculas endógenas cuja expressão ou localização indicam dano celular. Eles estão localizados na superfície celular e nas membranas intracelulares de células apresentadoras de antígenos, células parenquimais, cardiomiócitos e células endoteliais. Os TLR

são capazes de reconhecer os DAMPs sendo, portanto, uma das vias de ativação do processo inflamatório (27). Os receptores do tipo NOD (receptor de domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos) uma família de diversas proteínas citosólicas que também são capazes de reconhecer os DAMPs e recrutam outras proteínas para formar complexos de sinalização chamados inflamossomas que geram formas ativas das citocinas inflamatórias IL-1 e IL-18 (28, 29). Assim, os TLR e os receptores tipo NOD são fundamentais para o desencadeamento do processo inflamatório.

As principais células envolvidas na resposta imune inata são os fagócitos (neutrófilos e macrófagos). O recrutamento dos monócitos ocorre através da CCL2 (MCP-1). Logo após o IAM os neutrófilos aumentam imediatamente com um pico no 3º dia pós infarto (22). Os macrófagos aumentam progressivamente ao longo da primeira semana após o IAM. Os macrófagos são classificados em M1 e M2 de acordo com a expressão do marcador de superfície. Os macrófagos M1 são CD68⁺, eles predominam logo após o infarto do miocárdio do 1º ao 3º dia e têm como característica exibirem altos níveis de mediadores pró-inflamatórios. Os M2, são CD201⁺, estão presentes mais tardiamente, em torno do 5º dia e possuem um perfil anti-inflamatório com expressão de níveis elevados de IL-10 e genes reparatórios, porém também têm expressão pró-inflamatória (22). A IL-10 tem um papel de retroalimentação negativa, uma vez que é produzida pelos macrófagos e tem um papel inibitório sobre os próprios macrófagos e células dendríticas com a inibição de IL-1, IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF)- α (30).

A produção de citocinas pelas células durante o início do processo estimula a proliferação e a diferenciação dos linfócitos nas respostas imunes adaptativas. Com essa perpetuação o sistema imune adaptativo passa a ter um papel preponderante na inflamação crônica. Os quatro subgrupos de linfócitos T CD4⁺ são: Th1, Th2, Th17 e Treg. Suas características estão relacionadas com a produção específica de citocinas e fatores de transcrição expressos. As células Th1 produzem citocinas pró-inflamatórias como interferon (IFN) γ , TNF- α , e são efetivas na indução da resposta imune celular pela ativação de macrófagos e início da inflamação. A IL-12 estimula a diferenciação de células T CD4⁺ imaturas (naive) em células efetoras tipo Th1 (31). Os linfócitos Th2

secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, estão prioritariamente envolvidos em processos alérgicos, na estimulação dos linfócitos B para a produção de anticorpos e também suprimem a inflamação Th1 dependente (32). Já as IL-1, IL-6 e IL-23 estimulam a diferenciação para células tipo Th17 (33). As células Th17 têm como característica o recrutamento de leucócitos e indução da inflamação. Esses linfócitos produzem IL-17, IL-21 e IL-22 (34). As IL-17A e IL-17F que são produzidas pelas células Th17 são responsáveis pela inflamação imunológica com o estímulo à produção de outras citocinas e quimiocinas como o TNF que recrutam neutrófilos. A IL-17 está envolvida no processo de dano e cicatrização do tecido miocárdico após o IM, agravando o remodelamento precoce e tardio (35, 36). Os linfócitos Treg produzem IL-10 e TGF- β , e sua diferenciação é estimulada pela IL-2 e pelo próprio TGF- β (37-39).

Com relação a presença das células T CD4⁺ no coração após o IAM, as células T regulatórias e as células Th1 foram os subconjuntos encontrados predominantemente, enquanto as células Th2 e Th17 compreenderam populações menores (22). A IL-13 é produzida prioritariamente pelas células Th2 e tem um perfil semelhante ao da IL-4, desempenhando um papel inflamatório na alergia. Sua deficiência no IAM em modelos animais parece estar associado com dificuldade de cicatrização e piora do remodelamento cardíaco (40). A IL-4 e IL-13 desempenham papéis importantes na lesão renal aguda na polarização de macrófagos e células dendríticas para um fenótipo M2, fundamental para a recuperação da lesão renal aguda (41). Existem ainda os linfócitos T regulatórios CD4⁺ cuja função é modular as respostas imunológicas e manter a autotolerância. Eles expressam altos níveis do receptor de IL-2 (CD25) e têm o fator de transcrição FoxP3 que é fundamental para o desempenho do seu papel (42, 43). O TGF- β assim como a IL-2 são necessários para a diferenciação dessas células. Elas têm capacidade de produzir citocinas imunossupressoras como IL-10 e TGF- β e também promovem alto consumo de IL-2, devido a grande expressão de seu receptor. A IL-10 é produzida também pelos macrófagos e inibe a produção de várias citocinas inflamatórias pelos próprios macrófagos e células dendríticas, incluindo IL-1, TNF e IL-12. Após o IAM a IL-10 é capaz de diminuir o remodelamento cardíaco por estimular a polarização para macrófagos M2 (44).

As três principais citocinas pró-inflamatórias são TNF- α , IL-1 e IL-6. A TNF- α tem como principal fonte os macrófagos e também é produzida por linfócitos Th1, atua na ativação das células endoteliais e neutrófilos e induz apoptose em alguns tipos celulares. A IL-1 por sua vez é produzida não só por macrófagos, mas por outros tipos celulares como células endoteliais e algumas células epiteliais. Ativa as células endoteliais, estimula a síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado e a diferenciação de células T em Th17. A IL-6 é sintetizada pelos macrófagos, células endoteliais e células T. Também promove a síntese de fase aguda pelo fígado e diferenciação de células T em Th17 (23). O recrutamento de grande número de neutrófilos, seguido de monócitos, do sangue para os tecidos ocorre como parte da resposta inflamatória aguda. Tanto o TNF- α quanto o IL-1 induzem células endoteliais venulares pós-capilares a expressar E-selectina e aumentar sua expressão de ICAM-1 e VCAM-1, os ligantes para as integrinas dos leucócitos. Eles também estimulam várias células a secretar quimiocinas, tais como CXCL1 e CCL 2 (ou MCP-1), que se ligam a receptores nos neutrófilos e monócitos, respectivamente, aumentando a afinidade das integrinas de leucócitos por seus ligantes e estimulam o movimento direcional dos leucócitos (23).

Estudos recentes demonstraram que as citocinas pró-inflamatórias derivadas das células imunes regulam também componentes do SRAA acelerando ainda mais a formação sistêmica e local de angiotensina II. Especificamente, a regulação da produção de angiotensinogênio (AGT) por citocinas pró-inflamatórias no fígado e no rim é proposta como um mecanismo chave subjacente à progressão da hipertensão dependente de angiotensina II (45). O TNF- α já foi implicado em uma ampla gama de doenças renais e é produzido por um conjunto diversificado de linhagens celulares, incluindo células renais, tais como as células mesangiais e as células epiteliais renais (46, 47).

A TNF- α e a IL-6 promovem o acúmulo de células inflamatórias no interstício, aumentando a expressão de proteínas quimiotáticas de monócitos nos rins (48). Alguns desses biomarcadores são prognósticos para a mortalidade por todas as causas em pacientes com insuficiência cardíaca. O TGF- β pode apresentar um papel variado na inflamação renal, tanto ele é capaz de induzir fibrose em modelos de lesão renal aguda (49), como também pode ter efeito anti-

inflamatório (50). Outros estudos mostram ainda que no mesmo modelo pode apresentar ambos os efeitos inflamatório e anti-inflamatório em momentos distintos (51). Contudo, o TGF- β tem sido reconhecido cada vez por sua grande importância na inflamação e posterior fibrose renais (49, 52-54).

A quimiocina MCP-1 (CCL 2) é um dos principais impulsionadores do recrutamento de células inflamatórias para os rins, principalmente de monócitos/macrófagos, e tem sido proposto como biomarcador de danos renais (55). Os ratos SHR apresentam níveis basais aumentados de MCP-1, IL-1 β e IFN- γ quando comparados aos ratos normotensos, evidenciando a importância da inflamação na patogênese da HAS (56) nessa espécie de animais.

A IL-17A, a citocina efetora das células Th17, emergiu como um alvo terapêutico promissor em doenças inflamatórias imunológicas e crônicas, incluindo hipertensão e doença renal crônica (35, 57, 58). Agora, a IL-17A é considerada como uma citocina pleiotrópica envolvida na inflamação e destruição tecidual através da expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão e metaloproteases matriciais (35, 59). A IL-17A tem importante papel pró-inflamatório na HAS induzida por angiotensina II assim como na vasculopatia hipertensiva e na lesão de órgão alvo (60-62). A sua elevação em modelos de lesão renal pode também representar um processo autoimune na inflamação renal, como já demonstrado em outros trabalhos (63).

A IL-10 é uma interleucina pluripotente com características de regulação do sistema imune e anti-inflamatórias. Diversos trabalhos da literatura demonstram esse perfil em diferentes modelos de doenças renais, desde glomerulonefrites agudas até nefropatias crônicas (64-66). Um dos seus efeitos é um “downregulation” dos linfócitos Th17 mediado pelos linfócitos T reguladores (64). Também promove diminuição de IFN- γ e IL-2 (66).

A IL-13 tem um papel fundamental na polarização de macrófagos/células dendríticas para um perfil M2, que é de suma importância para recuperação de uma lesão renal aguda como a estudada neste trabalho (41).

Em um estudo realizado por Krum e colaboradores, com ratos Sprague-Dawley, foi visto que uma semana após IAM foi possível detectar número

aumentado de macrófagos no córtex renal e aumento da expressão de IL-6 e TGF- β . Além disso, o número de túbulos positivos para molécula de lesão renal 1 (KIM 1) apresentou um pico após 1 semana do IAM com posterior redução até a quarta semana com novo aumento a partir da oitava semana (67). Associado a essas alterações, ocorreu redução da TFG. Esses dados indicam que a ativação da inflamação renal é precoce após o IAM, já que os marcadores inflamatórios presentes são da fase aguda e mediados prioritariamente pela imunidade inata.

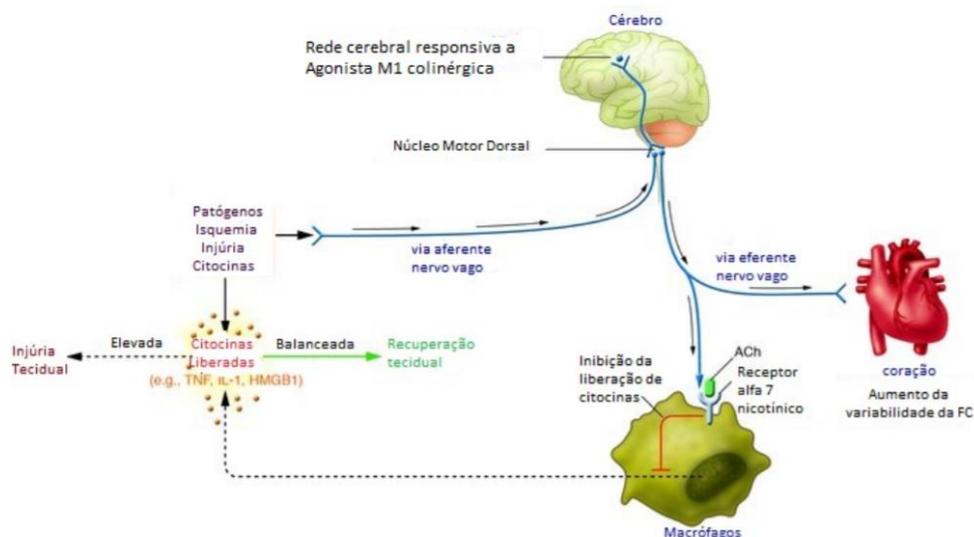
O aumento do fator de crescimento do fibroblasto 23 (FGF23) está associado ao aumento da mortalidade, hipertrofia ventricular esquerda, disfunção endotelial e progressão da DRC. É possível que o FGF 23 elevado na DRC possa contribuir diretamente para a lesão dos tecidos cardíaco, renal e vasos (68).

Neuroimunomodulação – via colinérgica anti-inflamatória

Existe um elo entre o sistema nervoso parassimpático e o sistema imunológico. Ele foi descrito pela primeira vez em 1972, quando foi demonstrado que a estimulação colinérgica muscarínica era capaz de atenuar a citotoxicidade do linfócito T; foram usadas acetilcolina e carbamilcolina nesse estudo (69). Em 2002, Tracey K. e cols desenvolveram o conceito do “Reflexo Inflamatório” (Figura 1). A descoberta de que a via eferente vagal (sistema colinérgico) é capaz de inibir a inflamação aguda (modelo de sepsis) ampliou o conhecimento da modulação das respostas imunológicas pelo sistema nervoso. A regulação da inflamação ocorre de maneira reflexa, assim como ocorre com as funções vitais controladas pelo sistema nervoso autônomo (SNA). Como um arco reflexo, ele possui uma via “sensitiva” aferente, integração no sistema nervoso central (SNC) e uma via eferente. Na presença de uma inflamação sistêmica, as citocinas pró-inflamatórias ativam áreas do SNC por estimulação direta (passando a barreira hemato-encefálica) ou por ativação das aferências do nervo vago. No SNC ocorre uma integração desses sinais e um há o desencadeamento de respostas à inflamação, como ativação do hipotálamo (levando à febre, alterações comportamentais, alterações no eixo hipófise-adrenal) e estimulação

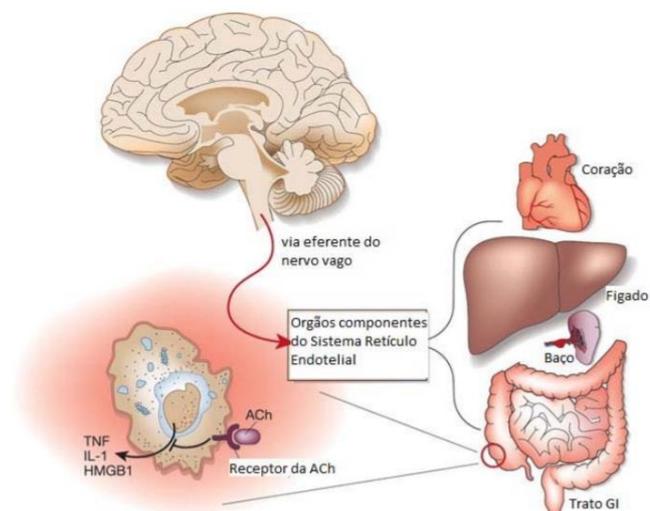
de núcleos de controle do SNA, relacionados ao sistema nervoso simpático e parassimpático. O aumento de atividade dos núcleos parassimpáticos estimula a atividade elétrica pelo nervo vago, que tem como neurotransmissor a acetilcolina (denominada via colinérgica). O sistema retículo endotelial, linfonodos, fígado e baço são inervados pelo vago (Figura 2). Demonstrou-se que a estimulação elétrica do nervo vago aumenta a liberação de acetilcolina no baço, e esse efeito está associado à redução da produção de citocinas (TNF) pelos macrófagos locais (dependente da estimulação de receptores alfa-7 nicotínicos). A estimulação do nervo vago foi capaz de diminuir a resposta inflamatória em diversos modelos de inflamação séptica ou asséptica (70). Estudos posteriores focaram nos mecanismos e via moleculares desse processo, e solidificaram o conceito de que a estimulação da via eferente vagal reduz a inflamação, tendo sido cunhado o termo “via colinérgica anti-Inflamatória” (71-74).

Figura 1: Neuro modulação: Reflexo Inflamatório.



Adaptação Tracey KJ. Nature, 2002. Estimulação por patógenos / isquemia da via aferente do nervo vago, ativando a via eferente do nervo vago com liberação de acetilcolina (ACh) no coração (aumentando a variabilidade da FC) e em receptores nicotínicos (receptor da ACh) em macrófagos teciduais, com inibição de citocinas (70).

Figura 2: Interação entre a via anti-inflamatória colinérgica e o sistema retículo endotelial.



Adaptação Tracey KJ. Nature, 2002. A atividade eferente do nervo vago leva à liberação de acetilcolina (ACh) em órgãos do sistema reticuloendotelial, incluindo fígado, coração, baço e trato gastrointestinal. A acetilcolina interage com receptores nicotínicos (receptor da ACh) em macrófagos teciduais, que inibem a liberação de TNF, IL-1, HMGB1 e outras citocinas (70).

Trabalhos conduzidos pelo grupo de Tracey K. e cols. demonstraram que o sistema nervoso parassimpático modula a resposta inflamatória por meio de atuação sobre as células efetoras relacionadas à imunidade inata e adquirida. A hiperatividade parassimpática, obtida por estimulação direta do vago ou por meio de drogas, funciona como um mecanismo contra regulador da liberação de citocinas durante o processo inflamatório (75-78).

Como dito, a estimulação do nervo vago eferente libera o neurotransmissor acetilcolina, que atua através da subunidade α -7 do receptor de ACh de nicotina (α -7 nAChR) que é expressa em macrófagos e linfócitos T regulatórios (79-82). Os macrófagos possuem ambos os tipos de receptores para acetilcolina, nicotínicos e muscarínicos, porém somente os receptores α -7 nAChR tem função na via anti-inflamatória colinérgica (83, 84). Camundongos *knockout* para o receptor α -7 nAChR se mostraram mais sensíveis a estímulos inflamatórios por liberarem maiores quantidades de TNF- α , IL-1 e IL-6, quando comparados com animais selvagens. Eles não respondem à acetilcolina nem à

nicotina, produzindo TNF- α , mesmo na presença deles (71).

A estimulação da “via anti-inflamatória colinérgica” (85-87) de forma direta (estimulação elétrica do nervo gago) ou indireta (exercícios físicos, drogas que inibem a enzima que degrada a acetilcolina) vem sendo utilizada como uma estratégia terapêutica para modulação da reação inflamatória e assim proteger contra as lesões agudas e crônicas causadas pelo processo inflamatório excessivo, como na sepse, artrite crônica, pancreatite, dentre outros modelos (75-78). Dados de nosso laboratório, como também de outros grupos, demonstraram que a disfunção do barorreflexo, a redução da modulação parassimpática e o aumento da resposta simpática identificada após o infarto do miocárdio, podem ser restauradas com intervenções fisiológicas e farmacológicas que atuam na via anti-inflamatória colinérgica (88-91). De forma significativa os efeitos da estimulação colinérgica estão relacionados com uma modulação na inflamação e melhora da função ventricular dos animais pós IAM.

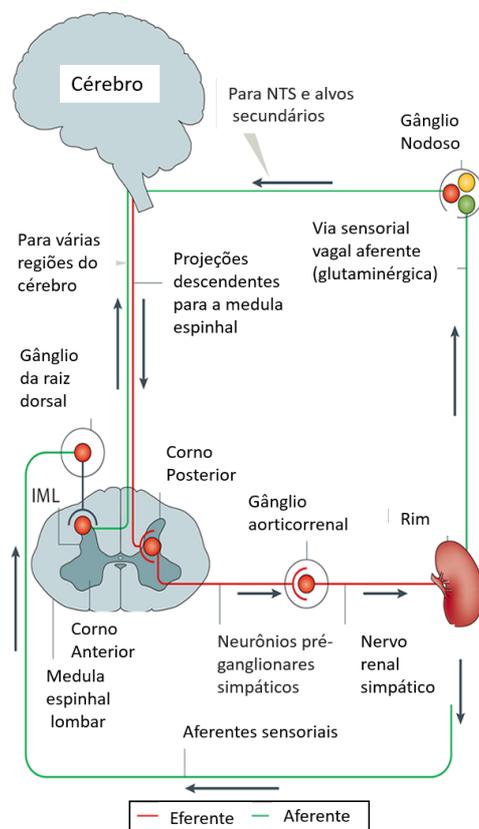
A piridostigmina (PI), um agente inibidor da enzima acetilcolinesterase, usada para tratar *Myasthenia Gravis*, reduzindo a hidrólise da acetilcolina foi utilizada. O tratamento com piridostigmina (PI) na dose de aproximadamente 31 mg/kg/dia aumentou a variabilidade da frequência cardíaca (FC) e pressão sistólica em ratos normais, sem modificações nos parâmetros hemodinâmicos basais. Considerando que a redução da variabilidade da FC e a sensibilidade do barorreflexo são fatores de risco independentes para doenças cardíacas, os presentes resultados apoiam o conceito de que a estimulação colinérgica com piridostigmina pode se tornar uma opção terapêutica para a disfunção vagal (91). Demonstramos que a administração precoce de PI, iniciada após a ligadura da artéria coronariana em ratos normotensos Wistar Kyoto (WKY) e mantida por 7 dias, associou-se a um significativo efeito anti-inflamatório no tecido cardíaco, caracterizado por aumento do recrutamento de células imunes com perfil anti-inflamatório, menor produção de citocinas pró-inflamatórias e menor estresse oxidativo (88, 90).

Um estudo de outro grupo mostrou que o uso de nicotina, que atua na via anti-inflamatória colinérgica, previne o infiltrado neutrofílico renal em modelo de isquemia e reperfusão renal (92). Já foi demonstrado também que a

piridostigmina (que não atravessa a barreira hematoencefálica) e o donepezil (capaz de atravessar a barreira hematoencefálica) são drogas eficazes na melhoria da função autônoma, no entanto, donepezil foi mais eficaz na redução dos níveis plasmáticos de TNF- α , IL-6 e IFN- γ em ratos SHR (93).

Na Figura 3 está descrito o circuito neural da inervação eferente e aferente renal.

Figura 3: Circuito neural da inervação eferente e aferente renal.



Adaptação de Okusa, Rosin e Tracey, 2017. Na via eferente, mostram-se projeções descendentes do cérebro, sinapse em neurônios pré-ganglionares simpáticos na coluna celular intermediolateral (IML) da medula espinhal torácica e lombar. Os neurônios simpáticos pré-ganglionares na medula espinhal lombar projetam-se através do corno anterior para o gânglio aorticorrenal e ativam o nervo simpático renal. Aferentes sensoriais no rim têm seus corpos celulares na região dorsal gânglios da raiz e sinapse centralmente em interneurônios no corno posterior da medula espinhal que transmite informações para várias regiões do cérebro. Embora o rim não pareça ter uma entrada eferente vagal, algumas evidências sugerem que neurônios aferentes vagais oriundos do gânglio nodoso inervem o rim, proporcionando assim um caminho para integração com o núcleo do trato solitário (NTS) e subseqüentes alvos neuronais secundários no cérebro (76).

Existem dados escassos na literatura sobre a modulação da resposta inflamatória renal mediada pelo aumento da atividade vagal em modelo de IAM. Ainda, pouco se avaliou com relação a essa resposta inflamatória no eixo cardiorrenal em modelo de ratos espontaneamente hipertensos. Os ratos SHR são oriundos de cruzamentos seletivos dos ratos WKY que apresentavam valores mais elevados de pressão arterial, e foram descritos pela primeira vez em 1963 por Okamoto e Aoki (94). Esse modelo animal é considerado um dos principais exemplos de hipertensão arterial que mimetiza a HAS neurogênica observada em humanos. Nos animais SHR, a inflamação do tecido renal bem como o desbalanço autonômico podem ser observados precocemente, e precedem o desenvolvimento da HAS (95, 96).

O desenvolvimento da HAS está relacionado com o aumento da reatividade vascular renal aos hormônios vasoativos. O dano vascular inicial leva a uma perda de autorregulação e hipertrofia arterial no córtex justa medular. A hipertrofia progressiva do meio arteriolar conduz ao colapso de alguns glomérulos, seguido de atrofia tubular. A filtração glomerular reduzida, portanto, leva à hiper filtração compensatória em outra população de glomérulos que desenvolvem proteinúria e glomeruloesclerose. Após 10 semanas esses ratos já se encontram hipertensos, porém a lesão renal secundária à HAS só se torna morfológicamente evidente após 30 semanas de vida (97). Esse modelo é o que se aproxima melhor da realidade dos pacientes, já que a disfunção renal se instala com maior frequência na população hipertensa.

1.1 Justificativa

Lesões renais são frequentemente detectadas em situações que se seguem a disfunções cardíacas. Nessa interação cardiorenal, mecanismos hemodinâmicos e inflamatórios estão envolvidos. A ativação do sistema anti-inflamatório colinérgico apresenta uma ação moduladora sobre componentes do sistema imune e, como consequência, leva à redução da produção de citocinas pró-inflamatórias e estimula o perfil anti-inflamatório das células imunes, em diferentes modelos experimentais. Este projeto traz informações sobre a inflamação renal após o IAM, em um modelo de ratos espontaneamente hipertensos. E testa a hipótese de que o aumento da via colinérgica pela administração de piridostigmina pode reduzir a inflamação renal, associada a melhora de função cardiocirculatória, nesse modelo experimental.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da estimulação vagal por meio da administração do brometo de piridostigmina (antagonista farmacológico da acetilcolinesterase) sobre a resposta da função cardíaca e inflamatória dos rins de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) após IAM.

2.2 Objetivos Secundários

Avaliar os efeitos da estimulação vagal por meio da administração do brometo de piridostigmina na fase aguda (7 dias após) após IAM em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), nos seguintes parâmetros:

- Hemodinâmicos (pressão arterial e frequência cardíaca), por meio do registro direto das curvas de pressão arterial na artéria femoral;
- Modulação autonômica por meio da análise dos componentes da variabilidade da frequência cardíaca nos domínios do tempo e da frequência;
- Verificar parâmetros morfofuncionais do coração por meio do exame de ecodopplercardiografia;
- Quantificar macrófagos tipos M1 e M2, linfócitos T totais e linfócitos T CD4⁺ no tecido renal, por meio da técnica de imuno-histoquímica;
- Quantificar a expressão gênica do mRNA de IL1, IL6, IL10, IL13, IL17A, TNF- α , TGF- β e MCP-1 em tecido renal com RT-PCR em tempo real;

3. Metodologia

3.1 Animais

Para realização deste estudo foram utilizados ratos da linhagem SHR, machos adultos, com 10-12 semanas de idade, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina do INCOR e mantidos no Biotério do setor de Experimentação, em condições sanitárias de biotério convencional, com controle de temperatura (22 a 24 C°) e controle de luminosidade (12h de claro e 12h de escuro).

Água e ração (Nuvilab da marca Nuvital, peletizada) foram oferecidas de modo irrestrito, sendo que a dieta ofertada foi normoprotéica (12% de proteínas). O manejo dos animais obedeceu aos princípios éticos da experimentação animal da Sociedade Brasileira da Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA). O projeto foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA protocolo N° 7612011118).

3.2 Sequência experimental

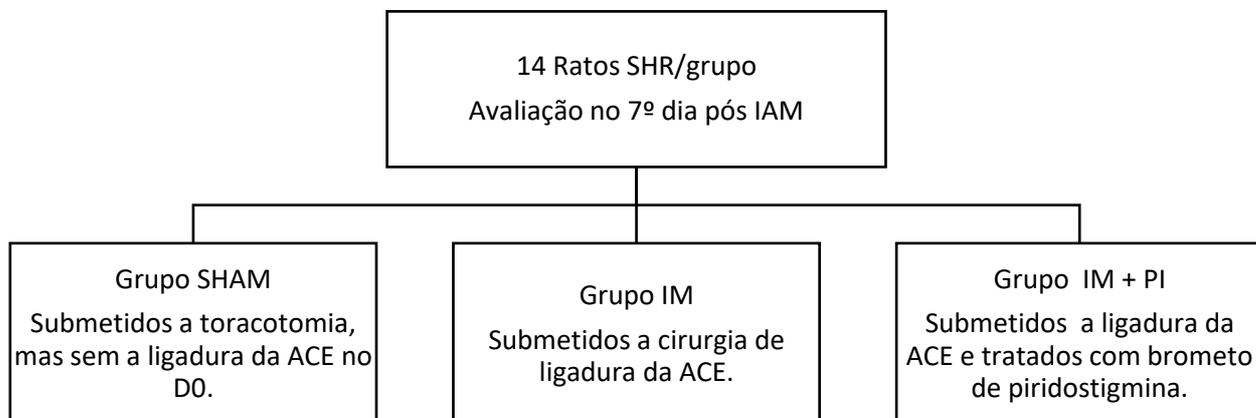
Os animais foram separados de forma aleatória em 03 grupos de 14 animais cada para avaliação no 7º dia pós IAM (Figura 4).

3.3 Grupos

Grupo SHAM (n:14): ratos foram submetidos a toracotomia, mas sem a ligadura da artéria coronária esquerda (ACE) no D0, acompanhados por 7 dias de protocolo.

Grupo IM (n:14): ratos foram submetidos a cirurgia de ligadura da ACE, acompanhados por 7 dias de protocolo.

Grupo IM + PI (n:14): ratos foram submetidos a toracotomia e a ligadura da ACE e foram tratados com brometo de piridostigmina.

Figura 4: Descrição dos Grupos Avaliados

O tratamento com brometo de piridostigmina (Sigma) foi iniciado 1h após o infarto, na dose de 40mg/Kg/dia, por 7 dias, administrado por gavagem 1x dia.

3.4 Sequência dos experimentos

Sequência dos experimentos realizados na avaliação após 7 dias de IAM (Figura 5).

- Dia 0 - Realização da toracotomia e oclusão da ACE; início do tratamento com PI;
- Dia 5 - Canulação da artéria femoral;
- Dia 6 - Registro das curvas de pressão arterial e realização do Ecodopplercardiograma;
- Dia 7 - Eutanásia do animal, retirada de espécimes biológicas, e armazenamento para posterior realização das demais análises.

Figura 5: Sequência dos experimentos.

D0	<ul style="list-style-type: none"> •Toracotomia e oclusão da ACE •Início do tratamento com PI
D5	<ul style="list-style-type: none"> •Canulação da artéria femoral
D6	<ul style="list-style-type: none"> •Registro das curvas de pressão arterial •Ecodopplercardiograma
D7	<ul style="list-style-type: none"> •Eutanásia do animal •Retirada e armazenamento de espécimes biológicas

3.5 Modelo experimental de infarto agudo do miocárdio

Os animais foram pesados e anestesiados com uma mistura de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (12mg/kg) via intraperitoneal e colocados em decúbito dorsal e entubados (Gelko-14G), para a respiração artificial, foi realizada então a toracotomia em hemitórax esquerdo, na altura do quarto espaço intercostal, sendo colocado um afastador entre as costelas para permitir a melhor visualização. O pericárdio foi seccionado e o átrio esquerdo afastado para visualização da artéria coronária esquerda (ACE). A ACE foi ligada (fio mononylon 6.0) provocando a isquemia miocárdica (Figura 6). Após a ligadura da coronária a incisão torácica foi fechada (fio mononylon 5.0) e o pneumotórax retirado mediante a sucção do ar com uma agulha (5x7) conectado a uma seringa de 10 ml. Logo após o animal foi retirado da ventilação artificial e estimulada a respiração espontânea. Os músculos afastados foram reposicionados pela pele suturada (fio mononylon 4.0). Os animais receberam 30000 UI de benzilpenicilinabenzatina (Penretard, Cibran, Tanquá, RJ, Brasil, I.M.) e foram colocados em ambiente aquecido para recuperação. Foi feita analgesia com tramadol 5mg/Kg e dipirona 50mg/Kg por via SC a cada 8 horas até eutanásia.

Figura 6: Indução do infarto agudo do miocárdio por ligadura da artéria coronária.

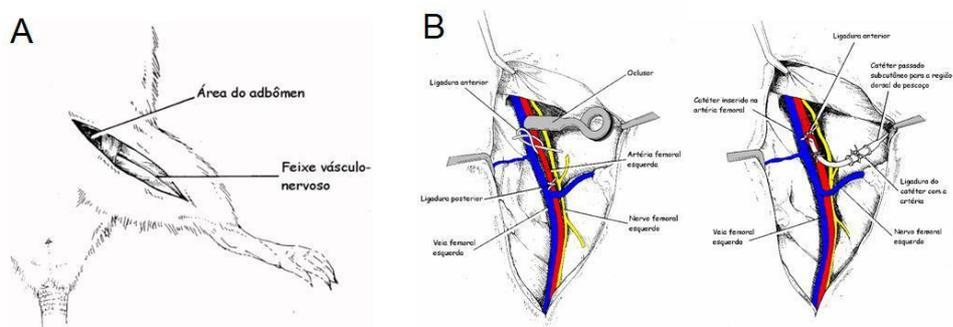


3.6 Canulação

Os animais foram anestesiados com ketamina (80 mg.kg) e xilazina (12 mg/kg) e mantidos em mesa cirúrgica aquecida (37° C), foram utilizados procedimentos assépticos e lupa cirúrgica (*surgical microscope* – DFV – M90) para a colocação de cânulas de polietileno (PE-10, com diâmetro interno de 0,01mm conectadas a uma peça de PE-50, com diâmetro interno de 0,05 mm).

A cânula foi preenchida com soro fisiológico e posicionada no interior da artéria femoral esquerda para registro da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca. A extremidade a qual se conectara ao transdutor de pressão foi fechada com pinos de aço inoxidável. Através de uma pequena incisão na região inguinal esquerda em direção ao feixe vâsculo-nervoso femoral, as extremidades da cânula de menor calibre (PE-10) foram introduzidas na luz da artéria femoral (Figura 7). A cânula foi fixada com fio de algodão na artéria e sua extremidade mais calibrosa foi passada no subcutâneo, exteriorizadas no dorso da região interescapular, fixadas com fio de algodão na pele. Após o término da cirurgia os animais foram tratados com uma única injeção de penicilina (Benzetacil), Fontoura-Wyeth, 60.000 U). Para a manutenção da cânula, a fim de se evitar obstruções, foram feitas lavagens precedentes ao registro de PA, usando-se 0,02ml de heparina sódica (Liquemine – Roche, 5.000U) em 0,5 ml de solução fisiológica de NaCl 0,9%. Após a canulação todos os animais foram mantidos em caixas individuais (Plexiglas, 25x15x10cm) e foi feita analgesia com tramadol 5mg/Kg e dipirona 50mg/Kg por via SC a cada 8 horas até eutanásia.

Figura 7: Sítio de dissecção para a cateterização da artéria femoral (A) e isolamento da artéria femoral e inserção do cateter (B).



3.7 Medida direta da pressão arterial

Os registros de pressão pulsátil foram realizados com tempo de 60 minutos, dos quais foram aproveitados os 15 minutos mais estáveis, fornecendo valores diretos da pressão arterial em todos os grupos experimentais. A cânula arterial foi conectada a uma extensão de 20 cm (PE-50), permitindo livre movimentação do animal pela caixa, durante todo o período do experimento. Esse sistema estava conectado a um pré-amplificador (Hewlett-Packard 8805C, Puerto Rico, EUA). Sinais de pressão arterial foram gravados em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (Windaq, 2KHz, DATAQ Instruments, Akron, OH, EUA), permitindo análise dos pulsos de pressão, batimento-a-batimento, com uma frequência de amostragem de 2000 Hz por canal, para estudo dos valores hemodinâmicos. A análise dos sinais de pressão foi realizada utilizando-se um programa comercial associado ao sistema de aquisição (Windaq™ Waveform Browser version 2.92, DATAQ instruments, Inc). Este programa permite a detecção de pico (sístole), vale (diástole) e períodos (entre um pico e outro) para cada onda de pulso, fornecendo os valores de pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) pela integral da área sob a curva no tempo. A frequência cardíaca foi calculada pelo intervalo de pulso (IP) que foi determinado a partir do intervalo entre dois picos sistólicos, calculando os valores da frequência cardíaca (FC) para cada batimento, através do inverso período multiplicado por 60 (segundos). Os resultados foram

apresentados em valores médios e erros padrões dos períodos em que os dados foram analisados para PA e FC. Na figura a seguir (Figura 8) segue o sistema de registro de Pressão Arterial.

Figura 8: Esquema do sistema de registro de Pressão Arterial.



3.8 Análise da variabilidade da frequência cardíaca espectral (VFC)

Os parâmetros para análise da VFC no domínio do tempo consistem em calcular os valores médios do intervalo de pulso. A variabilidade desta mesma variável foi quantificada pelo seu respectivo desvio padrão, além disso foi quantificada a raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes (RMSSD) e o desvio padrão de todos os intervalos RR normais gravados em um intervalo de tempo (SDNN). Para a análise no domínio da frequência, foi realizada a análise espectral dos registros basais utilizando o método da Transformada Rápida de Fourier (FFT). Foi utilizado o software Cardioseries (CardioSeries, versão 2.4, <http://www.danielpenteado.com>) para a análise dos sinais. As potências para as bandas de muito baixa (VLF, 0,0-0,20 Hz; modulação humoral), baixa (LF, 0,20-0,75 Hz; modulação simpática) e alta (HF, 0,75-3,0 Hz; modulação parassimpática) frequências foram calculadas pela integração da potência nas bandas de interesse e apresentadas como valores absolutos e normalizados. Para a normalização, as potências das bandas de LF e HF foram divididas pela

variância subtraída da potência na banda VLF. O acoplamento entre intervalo de pulso e pressão arterial sistólica foi estimado pela função de coerência. Valores de coerência (K) maior que 0,5 foram considerados significativos. Com relação à análise da variabilidade da PAS e do intervalo de pulso (IP), cada componente foi caracterizado pela sua amplitude (magnitude), expressa como potência e sua frequência correspondente. Espectros de cada segmento foram obtidos e agrupados em um espectro médio resultante para a PAS e IP. Os componentes oscilatórios foram quantificados nas faixas de baixa frequência (LF - 0,20 – 0,75 Hz) a qual representa componentes de modulação simpática.

3.9 Ecodopplercardiograma

O exame ecocardiográfico foi realizado para a quantificação da área infartada e avaliação de parâmetros morfofuncionais, em especial, a função ventricular, de acordo com a técnica já padronizada em nosso laboratório (Figura 9). Após anestesia com uma solução intraperitoneal ketamina (80 mg/kg) e xilazina (12mg/kg), os animais tiveram a região torácica devidamente tricotomizada e foram mantidos em decúbito lateral para a realização do exame no aparelho GE (Vivid 7, Corporation, CA-EUA), com transdutor linear multifrequencial (10-14mHz), que permite imagens bidimensional e monodimensional simultâneas, além da análise de fluxo por efeito doppler espectral eletrocardiográfico, mediante a colocação de três eletrodos para a derivação DII. A profundidade de imagem trabalhada foi de 2 cm.

Foram utilizadas as janelas longitudinais paraesternal direita para obtenção dos cortes longitudinal e transversal e a longitudinal paraesternal esquerda para a obtenção dos cortes apical (duas, quatro e cinco câmaras). As medidas lineares foram realizadas nas imagens obtidas pelo modo-M, e foram feitas medidas de área e eixo longitudinal do ventrículo esquerdo (VE). A função sistólica foi avaliada pela fração de ejeção (FE%) pelo método de Simpson modificado, por se mostrar mais fidedigno em corações infartados e pela velocidade de encurtamento circunferencial (VEC-circ/seg). A função diastólica foi avaliada utilizando-se os índices derivados da curva de velocidade de fluxo diastólico mitral e do fluxo sistólico da via de saída do ventrículo esquerdo

obtidos pela técnica de doppler pulsátil. A curva de velocidade do fluxo diastólico foi obtida a partir da imagem apical quatro câmaras, posicionando-se o transdutor próximo à face ventricular da valva mitral. Foram quantificadas: relação E/A - razão entre a velocidade máxima da onda E e a velocidade máxima da onda A, tempo de desaceleração da onda E (DESAC E) tempo em milissegundos (ms) entre o pico da onda E o ponto em que a rampa de desaceleração intercepta a linha de base da curva de velocidade do fluxo diastólico mitral. A curva de velocidade dos fluxos para análise do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) foi obtida posicionando-se o volume-amostra numa posição intermediária entra a valva mitral e a via de saída do ventrículo esquerdo.

Além das avaliações das funções sistólica e diastólica em separado, foi utilizado outro método de avaliação funcional combinado, o índice de desempenho miocárdico (IPM), derivado de intervalos obtidos pelo doppler pulsátil. Todas as medidas seguiram as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia.

Figura 9: Ecodopplercardiograma de um animal anestesiado.



Fonte: <https://imprensapucpr.files.wordpress.com/2011/05/veja-guarita-3.jpg>

3.10 Eutanásia do animal e coleta de tecidos

Foram realizados dois tipos de eutanásia, de acordo com a necessidade de coleta dos espécimes biológicos. Sendo os grupos subdivididos de maneira aleatória e proporcional (n = 07) para cada tipo de coleta.

Os subgrupos de animais direcionados ao estudo de citocinas renais foram submetidos à eutanásia por decapitação. O procedimento foi realizado por técnico capacitado, segundo princípios éticos da experimentação animal. Após decapitação, foi realizada a toracotomia e laparotomia, retirados os rins, que foram separados e colocados em nitrogênio líquido para posterior preparo para expressão gênica (PCR).

Os outros subgrupos de animais foram submetidos à eutanásia por meio de dose letal de anestésico e a seguir foram submetidos à perfusão dos rins, para posterior análise de imuno-histoquímica.

Utilizamos clorpromazina (medicação pré-anestésica) na dose de 50 mg/kg (intramuscular), e em seguida administramos pentobarbital (intraperitoneal) na dose de 80 mg/Kg associado a 10mg/ml de lidocaína. O monitoramento constante do animal até a ausência de reflexos oculopalpebrais e sensitivos foi realizado para garantir a total anestesia dos animais, logo então foi realizada incisão abdominal transversal, para exposição dos órgãos e seção do átrio direito e canulação do ápice do ventrículo esquerdo para perfusão do animal. O coração foi parado em diástole pelo uso de solução com cloreto de potássio (14 mmol em solução fisiológica), perfundido com pressão constante de 80-90 mmHg por um período de 10 a 15 minutos. Após este período, foi perfundido com formol 4% tamponado por mais 10 a 15 minutos. Os tecidos foram deixados de 24 a 48 horas fixando em formol (4% tamponado), processados (por desidratação, diafanização e parafinização do material) e posteriormente cortados em micrótomo (5 µm). Após o experimento, os animais foram armazenados em sacos leitosos com identificação e refrigerados, foram encaminhados posteriormente à incineração.

3.11 Avaliação de macrófagos e linfócitos no tecido renal por meio da imuno-histoquímica

No sétimo dia após a toracotomia, todos os animais de cada grupo foram anestesiados (80 mg/kg de cetamina e 12 mg/kg xylazine ip) e infundidos com 0,9% NaCl mais 14 mmol/l KCl solução (IV; com pressão igual a 13 cmH₂O) para parar o coração em diástole, seguido por uma perfusão de 4% de formalina tampão para fixação de tecido. Os rins excisados foram imersos em formalina por 24 h. Cortes transversais foram processadas e imersos em parafina. Seções seriais de tecidos embutidos em parafina (3 µm) foram colocadas em lâminas de vidro revestidas com 2% de 3-aminopropiltrieilano (Sigma-Aldrich) e desparafinadas em xileno, depois imersas em álcool e incubadas com 3% de peróxido de hidrogênio diluído em TBS (pH 7.4). As seções foram bloqueadas por incubação com soro de cabra 3% normal por 20 min e imersas em um tampão citrato (pH 6.0; Sigma-Aldrich) a 95°C por 20 min para recuperação de antígeno. Sinais não específicos foram bloqueados usando diluentes de anticorpos específicos (Anticorpo Diluente, cat. no. S0809; Dako, Glostrup, Dinamarca). Os slides foram então incubados com os seguintes anticorpos: CD3 (W3/25, cat. No. 111815; Abcam, Cambridge, Reino Unido), CD4 (W-8RT, cat. no. 31630; Abcam), CD68 (cat. no. 31630; Abcam) e CD206 (cat. no. 64693; Abcam).

As amostras foram mantidas durante a noite a 4°C em uma câmara umidificada. As seções foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário por 30 minutos. As seções foram então incubadas em 3,3'-diaminobenzidina em uma solução de cromogen (Dako) à temperatura ambiente por 2-5 min. Após as seções foram coradas com hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich) e seladas com uma lamínula.

A análise quantitativa das células positivas foi conduzida de forma cega, por observador experiente, contadas sob ampliação microscópica x400, utilizando o programa de análise de imagens Image J® versão 1.53d 2020 (free software, NIH, Bethesda, Maryland, EUA) e os resultados foram expressos com o número de células positivas por campo.

3.12 PCR em tempo real

O RNA total do rim foi extraído utilizando-se TRIzol Universal (Invitrogen, CA, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. O cDNA foi sintetizado usando o Sistema de Síntese First-Strand SuperScript III da Invitrogen de acordo com o procedimento recomendado pelo fabricante. Foi avaliado a expressão gênica de TGF- β 1, MCP-1, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-13, IL-17A e IL-10 por reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) no tecido renal. Para realização da PCR em tempo real foi utilizado o kit SYBR Green (Invitrogen, Califórnia, EUA) equipamento 7500™ RealTime PCR System (Applied Biosystems, Califórnia EUA). Os primers desenhados e usados para as citocinas estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: *Primers* das citocinas usadas.

Citocina	Sense	Antisense
TGF-β1	CTGCTGACCCCACTGATAC	AGCCCTGTATTCCGTCTCCT
MCP-1	GCTGCTACTCATTCACTGGCAA	GCTGCTGGTGATTCTCTTGTA
IL-1β	AAATGCCTCGTGCTGTCTGA	GCTGTTTTAGGGACACCGGA
TNF-α	CTCAAGCCCTG GTATGAGCC	CTCCAAAGTAGACCTGCCCG
IL-6	AGCGATGATGCACTGTCAGA	GGAActCCAGAAGACCAGAGC
IL-13	CCTGGAATCCCTGACCAACA	ATCCGAGGCCTTTTGGTTACA
IL-17A	CAAACGCCGAGGCCAATAAC	GGGTGAAGTGAACGGTTGA
IL-10	TTGAACCACCCGGCATCTAC	CCAAGGAGTTGCTCCCGTTA
β-actina	AGGAGTACGATGAGTCCGGCCC	GCAGCTCAGTAACAGTCCGCCT

O valor foi normalizado com a proteína β -actina como gene de referência e a expressão relativa para o mRNA foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

3.13 Análise estatística

Os dados foram analisados usando o GraphPad Prism versão 8.0 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, California). Foi usado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Todos os dados paramétricos foram representados como média \pm erro padrão e foi usado one-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação entre os grupos. Os valores de P inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

4. Resultados

4.1 Medidas hemodinâmicas

Os valores das PAS, PAD, PAM e da FC, avaliados diretamente pelo cateterismo da artéria femoral, estão apresentados na Tabela 2. O grupo SHAM apresentou níveis elevados de pressão arterial, de acordo com o esperado para essa espécie, que é espontaneamente hipertensa. Os grupos IM e IM + PI apresentaram níveis significativamente mais baixos de PAS, PAD e PAM quando comparados com o grupo SHAM. Essa redução dos níveis pressóricos se deu provavelmente devido ao impacto do IAM na contração ventricular. Entre os grupos infartado e infartado tratado com PI não houve diferença entre os níveis pressóricos e diastólicos, sugerindo que o tratamento não alterou o perfil hemodinâmico dos animais após o IAM. Não houve diferenças na FC entre os grupos experimentais.

Tabela 2: Medidas hemodinâmicas dos grupos estudados.

	SHAM	IM	IM + PI
Parâmetros			
PAS (mmHg)	205 ± 7	172 ± 20*	165 ± 13 [#]
PAD (mmHg)	145 ± 7	124 ± 14*	118 ± 11 [#]
PAM (mmHg)	173 ± 6	147 ± 17*	141 ± 11 [#]
FC (bpm)	378 ± 27	396 ± 25	374 ± 36

PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; FC: frequência cardíaca; PAM: pressão arterial média. Valores expressos em média ± SEM. *P < 0,0001 (vs SHAM); [#]P < 0,0001(vs SHAM), (n = 10, para cada grupo).

4.2 Análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC)

As análises da VFC nos domínios do tempo e da frequência (análise espectral) e da sensibilidade baroreflexa foram realizadas com o intuito de determinar a modulação parassimpática, a relação simpato-vagal, e a sensibilidade do baroreflexo respectivamente, e estão apresentadas na Tabela 3.

Os parâmetros RMSSD (raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos) e VARPI (variância do intervalo de pulso) são medidas da VFC no domínio do tempo. RMSSD reflete a variação batimento a batimento na frequência cardíaca, está correlacionado com a IC e reflete a capacidade autorregulatória do coração.

Animais infartados apresentaram aumento na relação simpato-vagal, (LF/HF) sugerindo que esse grupo desenvolveu maior atividade simpática.

O tratamento com PI aumentou significativamente o RMSSD e o VARPI, evidenciando maior modulação parassimpática nos animais tratados quando comparados com os grupos SHAM e IM + PI.

Com relação ao domínio de frequência foram realizadas análises nos componentes de alta frequência (HF), baixa frequência (LF) e muito baixa frequência (VLF). Foram realizadas análises em unidades absolutas (ms^2) e em unidades normalizadas (nu) das bandas LF e HF, que representam as modulações simpática e parassimpática, respectivamente. A normalização enfatiza o comportamento do balanço autonômico LF/HF dos dois ramos do sistema nervoso autônomo. Os animais tratados com PI tiveram uma modulação parassimpática evidenciada pelo aumento estatisticamente significativo de HF quando comparado com os grupos SHAM e IM. O IAM causou um desequilíbrio do balanço autonômico com um aumento da relação LF/HF quando comparado com o grupo SHAM e IM + PI, já o tratamento com piridostigmina foi capaz de restaurar esse balanço. Os animais tratados também tiveram um aumento significativo da sensibilidade baroreflexa caracterizada pelo maior alfa-index quando comparado aos demais grupos.

Tabela 3: Análise da variabilidade da frequência cardíaca espectral (VFC) e sensibilidade barorreflexa (alfa-index) dos grupos estudados.

	SHAM	IM	IM + PI
VFC			
RMSSD (ms)	6,2 ± 2,0	5,8 ± 2,2	9,1 ± 2,0 ^{#€}
VARPI (ms²)	28,5 ± 13,0	15,8 ± 6,0	63 ± 28,1 ^{#€}
LF (nu)	2,6 ± 2,0	2,5 ± 1,0	7,8 ± 4,5 ^{#€}
HF (nu)	9,7 ± 3,6	6,0 ± 3,0	23,9 ± 8,7 ^{#€}
LF/HF	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1*	0,4 ± 0,1
Alpha-Index (ms/mmHg)	0,5 ± 0,3	0,6 ± 0,2	1,1 ± 0,5 ^{#€}

RMSSD: raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes; VARPI: variância do intervalo de pulso; LF: banda de baixa frequência em unidades normalizadas; HF: banda de alta frequência em unidades normalizadas; LF/HF: balanço autonômico. Valores expressos em média ± SEM. *P < 0,05 (vs SHAM); [#]P < 0,05 (vs SHAM), [€]P < 0,05 (vs IM) (n = 10, para cada grupo).

4.3 Avaliação Ecocardiográfica

A avaliação ecocardiográfica está apresentada na Tabela 4. O IAM causou tanto repercussões estruturais quanto funcionais nos corações dos ratos, como esperado. Os ratos infartados, comparados ao grupo SHAM, apresentaram maiores diâmetros sistólico e diastólico de VE. Ainda, ocorreu significativa redução da função sistólica caracterizada pela menor fração de ejeção (FE) e menor Variação Fracional da Área do VE (FACVE %), e disfunção diastólica, caracterizada pela maior pressão de enchimento (relação E/A - onda de enchimento precoce/onda de contração atrial tardia) do VE.

Os animais infartados e tratados com PI, comparados ao grupo SHAM, apresentaram menores diâmetros do VE, maior FAC VE e menor relação E/A indicando melhora de parâmetros morfofuncionais do VE.

Os demais parâmetros ecocardiográficos estudados não apresentaram diferença entre os grupos estudados.

Tabela 4: Parâmetros Ecocardiográficos dos grupos estudados.

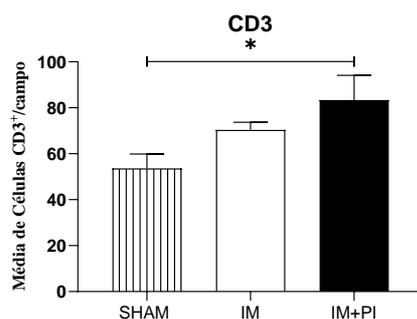
	SHAM	IM	IM + PI
Parâmetros do Eco			
Razão AO/AE (mm)	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1
DAE (mm)	4,2 ± 0,2	4,4 ± 0,3	3,9 ± 0,1
DVES (mm)	5,7 ± 0,7	7,4 ± 1,1*	6,1 ± 1,2 [€]
DVED (mm)	7,5 ± 0,6	8,7 ± 0,8*	7,3 ± 0,9 [€]
VE massa (g/Kg)	484,9 ± 65,6	533,7 ± 143,9	478,1 ± 167,1
FEVE %	49,8 ± 9,8	29,9 ± 15,3*	35,8 ± 11,3 [#]
FAC VE (%)	45,1 ± 7,3	26,5 ± 8,7*	34,8 ± 10,3 [€]
E/A	1,4 ± 0,2	2,3 ± 1,1*	1,6 ± 0,3 [€]
TRIV (ms)	17,9 ± 4,5	17,4 ± 3,5	20,0 ± 5,0

AO/AE: razão aorta/diâmetro atrial; DAE: diâmetro atrial esquerdo; DVES: diâmetro ventricular esquerdo sistólico; DVED: diâmetro ventricular esquerdo diastólico; FEVE: fração de ejeção ventricular esquerda; FACVE: variação fracional da área do ventrículo esquerdo; E/A: razão da onda E de enchimento precoce e da onda A de enchimento tardio; TRIV : tempo de relaxamento isovolumétrico. Valores expressos em média ± SEM. *P < 0,05 (vs SHAM); #P < 0,05 (vs SHAM), [€]P < 0,05 (vs IM) (n = 10, para cada grupo).

4.4 Avaliação de macrófagos e linfócitos no tecido renal por meio da imuno-histoquímica

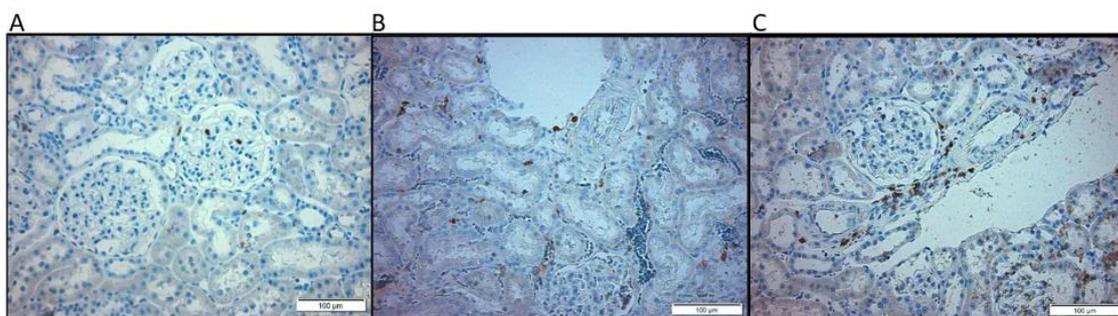
Com relação à contagem dos linfócitos T (CD3⁺) o grupo IM teve número maior, mas sem atingir significado estatístico. Porém, o grupo IM + PI apresentou quantidade aumentada de linfócitos CD3⁺ quando comparado com o grupo SHAM, desta forma evidenciou-se que a piridostigmina teve um efeito estimulante na migração renal dos linfócitos após o IAM. Não houve diferença estatisticamente significantes entre os demais grupos estudados (Figuras 10 e 11).

Figura 10: Representação gráfica da média da contagem de Linfócitos T (células CD3⁺) em tecido renal.



Os valores são expressos como média \pm SEM. *P < 0,05 (n = 6, para cada grupo). Os valores P foram calculados com ANOVA unidirecional seguido do teste pós-hoc de Tukey.

Figura 11: Imuno-histoquímica para a marcação de Linfócitos CD3⁺ em tecido renal



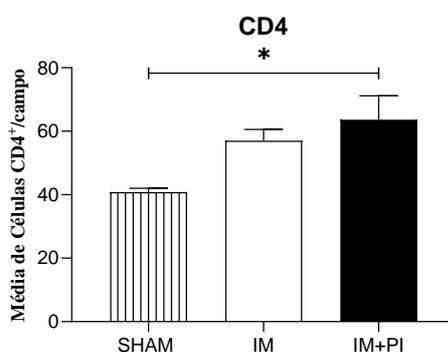
A: Grupo SHAM, B: Grupo IM, C: Grupo IM+PI (Aumento 400x)

O grupo IM teve número maior de células CD3⁺ comparado ao grupo SHAM, mas sem atingir significado estatístico. O grupo IM + PI apresentou número significativamente maior de CD3⁺ quando comparado com o grupo SHAM.

A contagem dos linfócitos T regulatórios CD4⁺ foi realizada de maneira semelhante as dos linfócitos totais (Figuras 12 e 13).

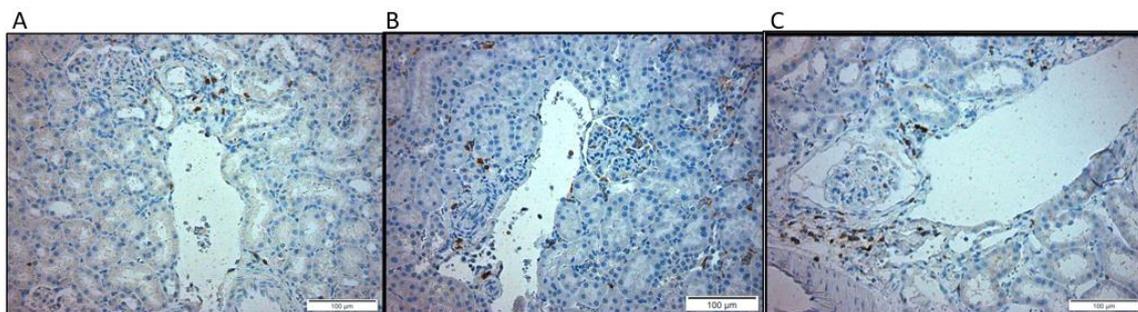
O grupo IM comparado ao grupo SHAM teve número maior, mas sem atingir significado estatístico. Porém, o grupo IM + PI apresentou quantidade aumentada de linfócitos CD4⁺ quando comparado com o grupo SHAM, desta forma evidenciou-se que a piridostigmina teve um efeito estimulante na migração renal dos linfócitos após o IAM. Os demais grupos não mostraram essa diferença.

Figura 12: Representação gráfica da média da contagem de Linfócitos T CD4⁺ em tecido renal.



Os valores são expressos como média \pm SEM. *P < 0,05 (n = 6, para cada grupo). Os valores P foram calculados com ANOVA unidirecional seguido do teste pós-hoc de Tukey.

Figura 13: Imuno-histoquímica para a marcação de Linfócitos CD4⁺ em tecido renal

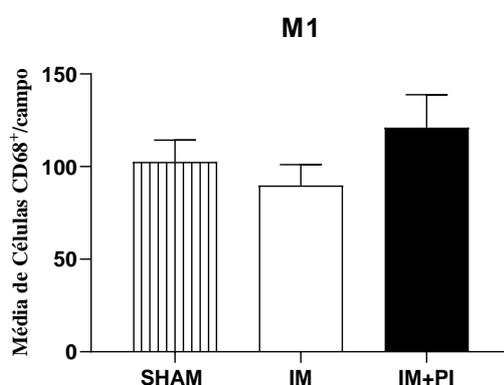


A: Grupo SHAM, B: Grupo IM, C: Grupo IM+PI (Aumento 400x)

O grupo IM teve número maior de células CD4⁺ comparado ao grupo SHAM, mas sem atingir significado estatístico. O grupo IM + PI apresentou número significativamente maior de CD4⁺ quando comparado com o grupo SHAM.

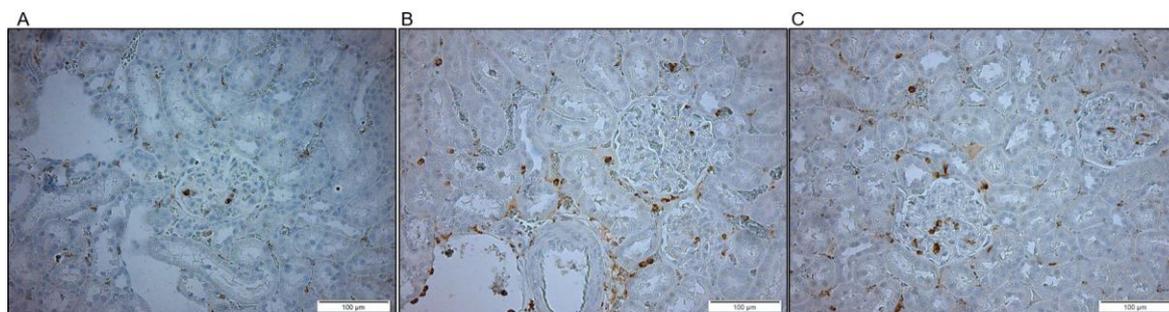
As contagens da marcação dos macrófagos tipo M1 (CD68⁺) e tipo M2 (CD206⁺) estão demonstradas abaixo (Figuras 14, 15, 16 e 17). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os 3 grupos estudados com relação aos macrófagos tipo M1 e tipo M2. Nem o IAM, nem o tratamento com piridostigmina tiveram influência no perfil renal dessas células no modelo estudado.

Figura 14: Representação gráfica da média da contagem de Macrófagos M1 (células CD68⁺) em tecido renal.



Os valores são expressos como média \pm SEM. (n = 6, para cada grupo). Os valores P foram calculados com ANOVA unidirecional seguido do teste pós-hoc de Tukey.

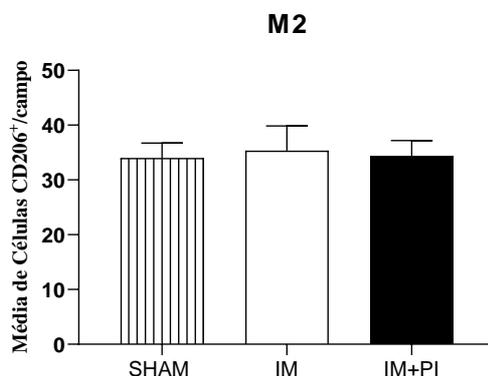
Figura 15: Imuno-histoquímica para a marcação de Macrófagos M1 (CD68⁺) em tecido renal



A: Grupo SHAM, B: Grupo IM, C: Grupo IM+PI (Aumento 400x)

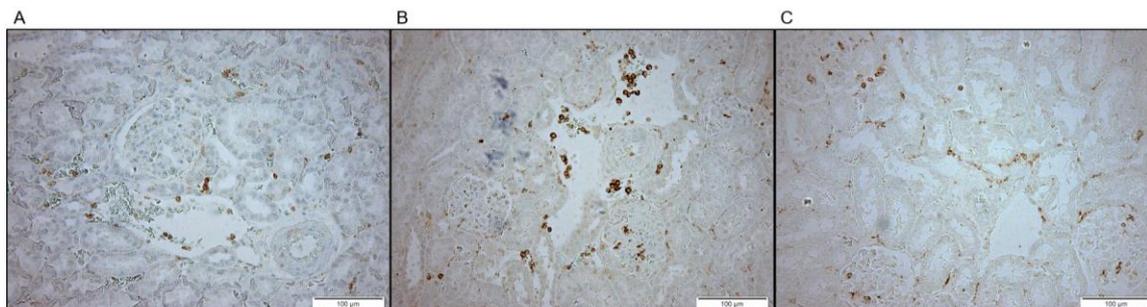
Não foram observadas diferenças significativas na no número de células CD68⁺ marcadas entre os Grupos.

Figura 16: Representação gráfica da média da contagem de Macrófagos M2 (células CD206⁺) em tecido renal.



Os valores são expressos como média \pm SEM (n = 6, para cada grupo).
Os valores P foram calculados com ANOVA unidirecional seguido do teste pós-hoc de Tukey.

Figura 17: Imuno-histoquímica para a marcação de Macrófagos M2 (CD206⁺) em tecido renal



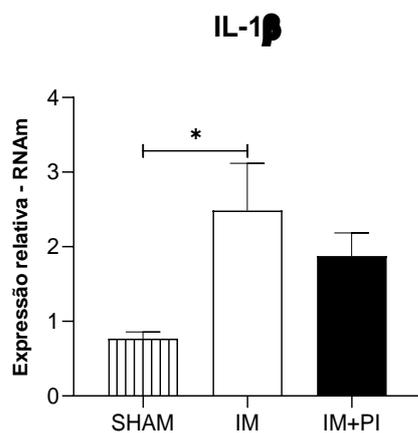
A: Grupo SHAM, B: Grupo IM, C: Grupo IM+PI (Aumento 400x).
Não foram observadas diferenças significativas na no número de células CD206⁺ marcadas entre os Grupos.

4.5 Análise de expressão de mRNA de genes pró-inflamatórios e anti-inflamatórios no tecido renal

As análises da expressão dos genes das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-17A e MCP-1/CCL-2) e dos genes das citocinas com características predominantemente anti-inflamatórias (TGF- β IL-13 e IL-10) foram feitas pela técnica de PCR em tempo real no tecido renal.

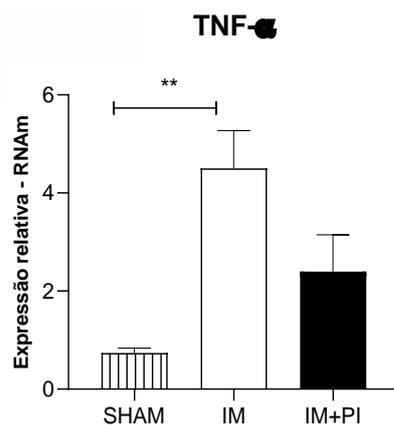
O grupo IM mostrou aumento significativo da expressão de mRNA das citocinas pró-inflamatórias: IL-1 β e TNF- α , quando comparados com o grupo SHAM (Figuras 18 e 19).

Figura 18: Expressão de mRNA da citocina IL-1 β no tecido renal.



Expressão de mRNA de genes *IL-1 β* de citocina no rim após IM. Os dados são expressos como média \pm SEM. *P < 0,05 vs grupos SHAM e IM (n = 6, para cada grupo).

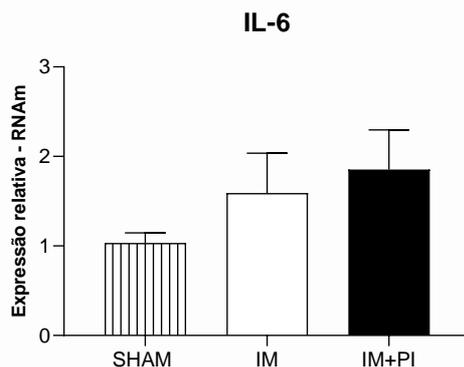
Figura 19: Expressão de mRNA da citocina TNF- α no tecido renal.



Expressão de mRNA de genes *TNF- α* de citocina no rim após IM. Os dados são expressos como média \pm SEM. **P < 0,01 vs grupos SHAM e IM (n = 6, para cada grupo).

A análise da expressão gênica de IL-6 renal, também pró-inflamatória, não mostrou alterações após o IAM, nem tampouco com o tratamento com piridostigmina (Figura 20).

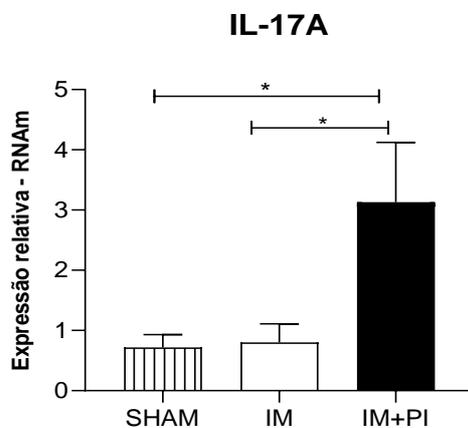
Figura 20: Expressão de mRNA da citocina IL-6 no tecido renal.



Expressão de mRNA de genes *IL-6* de citocina no rim após IM. Os dados são expressos como média ± SEM (n = 6, para cada grupo).

O grupo IM+PI apresentou níveis significativamente aumentados da expressão de mRNA de IL-17A quando comparados ao grupo SHAM e ao grupo infartado. Mostrando o efeito positivo do tratamento da PI sobre essa interleucina (Figura 21).

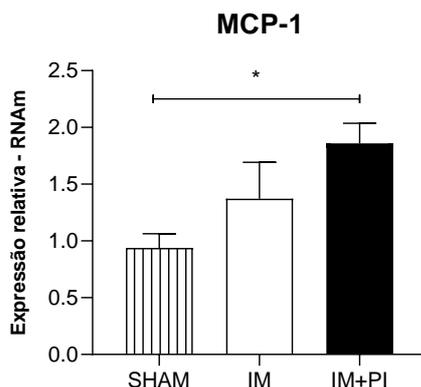
Figura 21: Expressão de mRNA da citocina IL-17A no tecido renal.



Expressão de mRNA de genes *IL-17A* de citocina no rim após IM. Os dados são expressos como média ± SEM. *P < 0,05 vs grupos SHAM e IM (n = 6, para cada grupo).

Já a expressão do mRNA de MCP-1 não apresentou aumento significativo após o IAM, mas foi significativamente maior no grupo IM+PI quando comparado com o grupo SHAM (Figura 22). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo SHAM e o grupo IM.

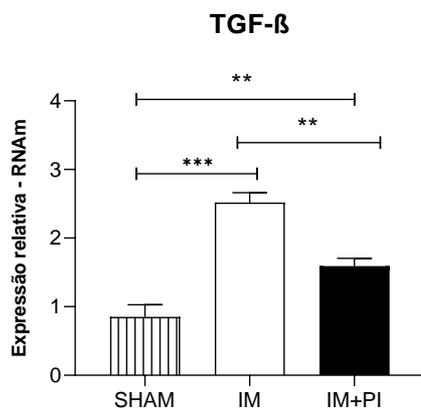
Figura 22: Expressão de mRNA da citocina MCP-1 no tecido renal.



Expressão de mRNA de genes *MCP-1* de citocina no rim após IM. Os dados são expressos como média \pm SEM. * $P < 0,05$ vs grupos SHAM e IM (n = 6, para cada grupo).

A expressão do mRNA TGF- β foi significativamente aumentada no grupo IM quando comparado com ambos os grupos SHAM e IM+PI. O tratamento com piridostigmina foi eficaz em reduzir a sua expressão renal, considerando-se o valor significativamente menor no grupo IM+PI comparado ao grupo IM (Figura 23).

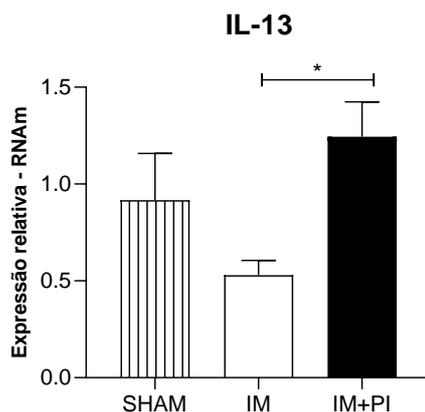
Figura 23: Expressão de mRNA da citocina TGF- β no tecido renal.



Expressão de mRNA de genes *TGF- β* de citocina no rim após IM. Os dados são expressos como média \pm SEM. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs grupos SHAM e IM (n = 6, para cada grupo)

A expressão de mRNA de IL-13 foi maior nos ratos infartados e tratados com PI quando comparado com os ratos infartados não tratados (Figura 24). Com relação à IL-13 não houve diferença estatísticas entre o grupo SHAM e os grupos infartados.

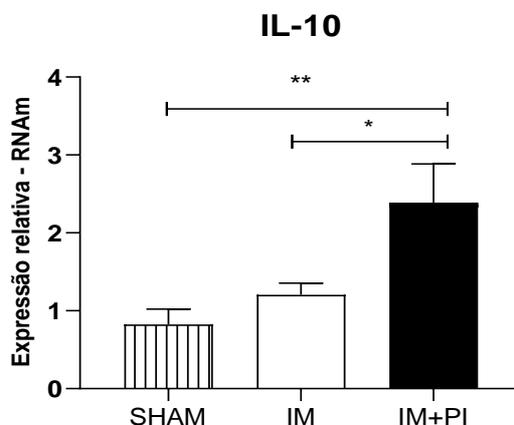
Figura 24: Expressão de mRNA da citocina IL-13 no tecido renal.



Expressão de mRNA de genes *IL-13* de citocina no rim após IM. Os dados são expressos como média ± SEM. *P < 0,05 vs grupos SHAM e IM (n = 6, para cada grupo).

O grupo IM+PI apresentou níveis significativamente aumentados da expressão de mRNA de IL-10 quando comparados ao grupo SHAM e ao grupo infartado (Figura 25), ficando evidente o impacto positivo do tratamento com PI.

Figura 25: Expressão de mRNA da citocina IL-10 no tecido renal.



Expressão de mRNA de genes *IL-10* de citocina no rim após IM. Os dados são expressos como média ± SEM. *P < 0,05; **P < 0,01 vs grupos SHAM e IM (n = 6, para cada grupo).

Fizemos uma análise agrupando as citocinas de acordo com sua relação com os subtipos de linfócitos CD4⁺. O infarto aumentou a expressão gênica de citocinas relacionadas as vias Th1 (IL1- β , TNF- α) e Treg (TGF- β) no tecido renal. A administração de PI modulou de forma significativa a expressão gênica de várias vias: inibiu a via Th1 (IL1- β , TNF- α) e Treg (TGF- β), estimulou as vias Th2 (IL-10 e IL-13) e Th17 (IL-17). Ainda a PI aumentou a quimiocina (MCP-1/CCL-2) que potencializa a migração de macrófagos para o tecido renal.

Tabela 5: Sumário dos Resultados

Variáveis analisadas	Grupos		
	SHAM	IM	IM + PI
FC	↔	↔	↔
PAS / PAD / PAM	↑	↔	↔
RMSSD / VARPI / LF (nu) / LF (nu) / LF (nu) / Alpha-Index	↔	↔	↑
LF/HF	↔	↑	↔
DVES / DVED / E/A	↔	↑	↔
FEVE % / FAC VE (%)	↔	↓	↑
CD3 ⁺ / CD4 ⁺	↔	↔	↑
M1 /M2	↔	↔	↔
IL-1 β / TNF- α	↔	↑	↔
IL-10 / IL-17A	↔	↔	↑
IL-13	↔	↓	↑
MCP-1	↔	↔	↑
TGF- β	↔	↑↑	↑
IL-6	↔	↔	↔

5. Discussão

O principal achado do presente estudo foi a demonstração de que o tratamento de curto prazo com PI após IAM, além de melhorar parâmetros morfofuncionais cardíacos demonstrou a capacidade de modular a inflamação renal em ratos SHR. De acordo com nossos resultados, esse fenômeno foi caracterizado pelo impacto positivo do tratamento com PI em parâmetros morfofuncionais cardíacos, pela diminuição da expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias (via Th1) e aumento da expressão de genes de citocinas anti-inflamatórias no tecido renal (via Th2). O impacto da modulação sobre elementos relacionados as vias Th17 e Treg merecem mais estudos.

A inflamação renal, mecanismo importante na patogênese da síndrome cardiorenal foi, assim, modulada pelo aumento do estímulo colinérgico mediado pela administração de PI. Esse fato pode não somente minorar os efeitos diretos do IAM sobre a função dos rins, mas também diminuir a progressão da lesão cardíaca para uma IC, uma vez que a doença renal também contribui para a piora da função cardíaca em curto, médio e longo prazos (9,10,15).

Há uma crescente apreciação de que as vias inflamatórias sistêmicas são ativadas em uma variedade de condições médicas e que elas desempenham um papel importante no desenvolvimento de desfechos adversos (98-101). Com relação ao impacto sistêmico da resposta inflamatória após IAM, estudos em animais demonstraram uma intensa mobilização de células imunes de origem hematopoiética e também de linfócitos para a área de isquemia cardíaca, bem como de outros tecidos (99, 100, 102). O IAM pode alterar a função renal por múltiplos mecanismo, destacando-se entre eles, a inflamação renal (109, 111, 115) e a ativação do SNS (sistema nervoso simpático) (116) e do SRAA (42, 110). Todos esses elementos atuam conjuntamente na indução da fibrose intersticial (63), com implicações diretas para o desenvolvimento da síndrome cardiorenal (63, 12).

Nas últimas duas décadas estabeleceu-se o conceito de que a estimulação elétrica direta do nervo vago ou a administração de drogas que aumentam a atividade colinérgica (anticolinesterásicos) tem efeito supressor da atividade inflamatória em diversos modelos animais de infecção e de inflamação

asséptica crônica, sendo cunhado o termo “reflexo colinérgico anti-inflamatório” (70, 75, 87). Recentemente, estudos clínicos têm evidenciado efeitos semelhantes na redução da inflamação pela estimulação vagal (103, 104).

A PI é uma droga que inibe a atividade da enzima acetilcolinesterase aumentando a disponibilidade de acetilcolina, e é usada como rotina para o tratamento da Miastenia Gravis. Essa droga vem sendo estudada como medicamento capaz de promover modulação vagal em doenças inflamatórias crônicas, tanto em modelos animais como em humanos (105-107).

Estudos prévios de nosso grupo demonstraram que após o IAM a administração de PI foi capaz de melhorar o equilíbrio autonômico cardíaco, a sensibilidade barorreflexa e reduzir a inflamação e o estresse oxidativo no tecido cardíaco com melhora morfofuncional do miocárdio de ratos WKY infartados (88, 90, 108).

Pouco se sabe sobre o impacto da modulação vagal sobre a inflamação na relação cardiorrenal, especialmente em ratos SHR. Entretanto, alguns estudos que estimularam a via colinérgica por meio da administração de nicotina sugeriram proteção renal em modelos de isquemia/reperfusão renal (88, 98) com redução de valores pressóricos em ratos SHR (106).

Os ratos SHR apresentam como característica da espécie disfunção autônoma com aumento do tônus simpático, diminuição da atividade parassimpática e uma inflamação crônica, e desta forma, pela semelhança com as características encontradas em humanos, são excelentes modelos de IAM (95, 109). Ratos SHR desenvolvem valores muito elevados de pressão arterial já nos primeiros meses de vida, e alterações na função renal mediada por ativação imune estão diretamente relacionadas ao mecanismo desencadeador desse processo (59, 93). Além disso, como a presença de IAM deve potencializar mecanismos inflamatórios renais (115), o uso de ratos SHR para se estudar o eixo cardiorrenal após IAM se justifica.

Efeitos da PI em parâmetros hemodinâmicos e na modulação autonômica

O IAM, como esperado, foi associado a uma grande redução da PAS e PAD, provavelmente relacionada a disfunção ventricular esquerda e redução de débito cardíaco. O tratamento com PI reduziu, de forma discreta, porém significativa, ainda mais esses valores. Estudos anteriores demonstraram que uso de drogas anticolinesterásicas atenuaram o desenvolvimento de hipertensão e de marcadores inflamatórios (110), e melhoraram a disfunção vascular em ratos SHR. Um impacto modesto, mas significativo também foi evidenciado em estudo prévio, na PAS (12 mmHg) e PAD (14 mmHg) com o tratamento com PI em ratos SHR. Isso foi diferente do encontrado em outro estudo em que a estimulação colinérgica por meio de nicotina aumentou os níveis pressóricos dos ratos SHR (111).

No período de avaliação de nosso estudo (7 dias após o IAM) não foi encontrada diferença significativa na FC entre os grupos. Assim, não foram observados aumentos reflexos de FC nos grupos infartados, nem efeitos adicionais de redução da FC relacionados a PI. Pode-se especular que um dos possíveis mecanismos de atuação da estimulação vagal em modelo de IAM seja através da redução da FC com conseqüente diminuição do trabalho cardíaco e diminuição do consumo de oxigênio. Porém já foi demonstrado que a ação benéfica da modulação colinérgica independe da diminuição da FC em modelo animal de isquemia/reperfusão (112).

No presente estudo, o IAM foi capaz de aumentar uma atividade simpática basal já elevada, caracterizada pela maior relação simpato-vagal (LF/HF) do grupo IM comparado ao grupo SHAM.

Os animais tratados com PI apresentaram aumento significativo de marcadores da VFC no domínio do tempo relacionados à modulação vagal, RSSM e VARPI. Considerando-se que ambos estão relacionados às avaliações do desvio padrão dos intervalos de pulso (IP) e sofrem influência rápida do estímulo parassimpático, podemos dizer que de fato a PI teve o efeito farmacológico desejado.

Com relação aos componentes da VFC no domínio da frequência, podemos evidenciar que ratos tratados com a PI tiveram aumento significativo

do LF(nu) e do HF(nu), que identificam respectivamente a atividade simpática e parassimpática. Está bem estabelecido que a acetilcolina tem papel tanto no sistema nervoso autônomo simpático quanto parassimpático. No sistema nervoso simpático, a acetilcolina é o neurotransmissor pré-ganglionar e a noradrenalina é pós-ganglionar. Já no sistema nervoso parassimpático, a acetilcolina é tanto o neurotransmissor pré como pós-ganglionar (113, 114). Desta forma, pode-se sugerir que o efeito inibitório da PI sobre a acetilcolinesterase atue também no sistema nervoso simpático. Porém, mesmo com o aumento das bandas LF e HF, obteve-se uma melhora do balanço autonômico (LF/HF), e como resultado final ocorreu aumento da modulação parassimpática.

Do ponto de vista clínico, o desequilíbrio da relação simpato-vagal que se segue ao IAM é diretamente proporcional ao pior prognóstico dos pacientes. De fato, um maior predomínio da atividade simpática e uma pior sensibilidade do barorreflexo são preditores independentes de mortalidade e morbidade cardiovascular, tanto nas fases aguda, quanto crônicas após IAM (115). Outros estudos que avaliaram efeito de anticolinesterásicos também demonstraram efeito benéfico sobre o balanço autonômico em ratos SHR (96, 110, 116).

Efeitos da PI em parâmetros morfofuncionais cardíacos

Como previsto, os animais submetidos a ligadura da artéria coronária esquerda apresentaram significativa lesão muscular (IAM) e conseqüente alterações funcionais em diferentes parâmetros: disfunção sistólica (redução da fração de ejeção e variação fracional da área do ventrículo esquerdo), disfunção diastólica (aumento da relação E/A) e sobrecarga de câmaras esquerdas (dilatação do VE).

O tratamento com PI mostrou impacto discreto, mais significativo nas funções sistólica e diastólica dos animais infartados, assim como melhora dos parâmetros morfológicos do VE. Efeitos semelhantes foram previamente descritos por nosso grupo em ratos WKY também tratados com PI, e em modelos de IAM com estimulação direta do nervo vago (88, 108). Os animais tratados com PI apresentaram diâmetros ventriculares sistólicos e diastólicos

semelhantes ao do grupo controle. A função ventricular esquerda avaliada através do FAC foi melhor nos ratos tratados quando comparada aos animais infartados sem tratamento, porém essa função permaneceu pior que a dos ratos não infartados. A disfunção diastólica avaliada através da onda E/A também foi revertida nos animais infartados tratados. Assim, fica evidente que o tratamento com PI é eficaz ao atuar de forma precoce no remodelamento e função do miocárdio após o IAM. Estudos anteriores demonstraram que o coração de ratos SHR infartados avaliados meses após o evento inicial são mais susceptíveis ao desenvolvimento de disfunção ventricular, independente do remodelamento estrutural, provavelmente decorrente de menor reserva adrenérgica inotrópica que ocorre nessa espécie (117). Ainda, a recuperação pós-isquêmica da função contrátil, a gravidade das arritmias ventriculares e a lesão letal (tamanho do infarto) são agravadas nos corações hipertrofiados de ratos SHR em comparação com ratos normotensos (118). Assim, a melhora precoce de parâmetros funcionais com a administração da PI pode ter um impacto na recuperação a médio e longo prazos da função ventricular após agressão isquêmica nesse modelo de disfunção ventricular.

Efeitos da PI no infiltrado de macrófagos e linfócitos nos rins

O IAM não foi associado a um aumento do número de macrófagos e nem da relação M1/M2 no tecido renal de ratos SHR. Esse achado pode ser considerado, até certo ponto, inesperado. Estudos anteriores demonstraram a infiltração de macrófagos no córtex renal 3 e 7 dias após IAM (67, 119) sugerindo que a mobilização de células imunes como resposta precoce na síndrome cardiorenal. Devemos destacar, entretanto, que ambos os estudos foram realizados em ratos normotensos.

O IAM aumenta a atividade simpática, e esse estímulo atua diretamente aumentando a mobilização de células imunes para vários tecidos (102), incluindo o tecido renal. Ainda, em ratos SHR, por já apresentarem um estado inflamatório basal, com presença de células imunes nos rins, esperávamos detectar uma maior exacerbação da resposta inflamatória renal após IAM. Os macrófagos se apresentam com dois fenótipos distintos, o que leva a um papel variado na

inflamação renal a depender do fenótipo envolvido. Os macrófagos M1 são pró inflamatórios e podem causar lesão renal, já os M2 são anti-inflamatórios e têm um perfil reparador (120, 121).

Porém, alguns aspectos podem ajudar na interpretação deste achado. O local onde foi avaliada a infiltração celular pode ter sido diferente entre os estudos. No presente estudo optou-se por contabilizar o número de células imunes em tecido renal, englobando o conjunto das regiões glomerular e interstício cortical e medular, enquanto no estudo anterior observou-se somente a região interstício cortical. Dentre os mecanismos associados ao desenvolvimento de hipertensão arterial nos ratos SHR a pressão de perfusão renal é muito importante (93). Estudos em modelos de animais hipertensos e diabéticos demonstraram que o controle da hiperfiltração glomerular e redução da pressão de perfusão com administração de inibidores do SRAA, podem reduzir a progressão da doença renal (122, 123). Inferimos que a queda de PA após o IAM pode ter reduzido a carga pressórica no sistema vascular do néfron reduzindo estímulos inflamatórios locais. Assim, um potencial aumento da atividade simpática, que é um fator que aumenta a resposta imune renal, pode ter sido contrabalançada pela menor pressão de perfusão renal que seria um efeito protetor, reduzindo a mobilização de células imunes renais. Ainda é possível que a mobilização de células imunes renais em ratos SHR e ratos WKY ocorram em momentos diferentes após o IAM.

Após tratamento com PI, observamos o aumento da expressão gênica de MCP-1/CCL-2, quimiocina estimuladora do recrutamento de macrófagos (55), e esperava-se que esse aumento fosse seguido de um infiltrado macrofágico em tecido renal, o que não ocorreu. A infiltração renal por linfócitos T auxiliares, com estimulada pelo uso da PI, por sua vez, também poderia ter como consequência um aumento secundário do perfil M2 dos macrófagos, já que esses linfócitos alteraram os genes de citocinas das vias Th1/Th2 que modulam a polarização para M2 (124). Esse fenômeno mais uma vez não aconteceu. Em um trabalho prévio a denervação renal promoveu a redução da ativação de monócitos, inclusive com a diminuição de outros marcadores inflamatórios (125). No nosso modelo, a redução da modulação simpática não se acompanhou da redução de macrófagos no infiltrado renal.

Em outro estudo, a estimulação colinérgica nicotínica em ratos SHR causou um aumento inesperado de infiltrado renal por células M1 associado ao aumento de MCP-1 e início precoce do quadro de HAS, e nem a denervação renal foi capaz de coibir esse efeito (63). Somente quando a denervação foi associada a ablação de células M1, a estimulação nicotínica foi eficiente em coibir o desenvolvimento da hipertensão (126). Isso evidencia uma disfunção na resposta dos macrófagos M1 e a sua importância na etiologia da hipertensão nos ratos SHR, já que a estimulação colinérgica nos macrófagos de ratos normotensos tem efeito anti-inflamatório, oposto ao que aconteceu nos ratos SHR neste estudo (126).

Um outro resultado importante do nosso estudo foi a demonstração de que no grupo de ratos infartados tratados, houve significativo aumento de linfócitos T e de linfócitos do subtipo CD4⁺, potencialmente auxiliares. Eles são fundamentais na cicatrização e no controle do remodelamento pós IAM (82, 127). Em lesões renais agudas e crônicas também já foi demonstrado o papel primordial dos linfócitos T regulatórios no controle da inflamação (128). É importante salientar a importância do subtipo de linfócito T envolvido, eles se dividem em CD4⁺, com seus sub tipos Th1, Th2, Th17 e Treg (regulatório - CD4⁺CD25⁺FoxP3). Os linfócitos Treg apresentam papel anti-inflamatório na lesão renal aguda (129). Quando os linfócitos T foram avaliados de maneira geral, sem a definição dos subtipos envolvidos, um estudo mostrou que em modelo de síndrome cardiorrenal tipo 1 a supressão de linfócitos T foi capaz de diminuir a lesão renal (130). Já quando se avalia especificamente os linfócitos Treg observa-se que eles são capazes de limitar a inflamação renal e sistêmica e que a diminuição desse perfil celular pode estar associada ao surgimento de doenças autoimunes (131). No nosso estudo, não foram feitas marcações para cada tipo específico, mas considerando-se a modulação da expressão gênica dos grupos de citocinas, podemos dizer que claramente a relação Th1/Th2 foi invertida pela PI. Porém, houve possível supressão da via Treg e estimulação da via Th17.

Um fenômeno denominado “*Hit and Run*” foi descrito pela primeira vez na lesão renal aguda em lesão de isquemia e reperfusão. Nele, ocorre um infiltrado celular renal de linfócitos T inesperadamente precoce, 1 hora após a

injúria, com rápido desaparecimento (24h após o início da lesão), mas com à perpetuação dos efeitos inflamatórios desencadeados pelas células, mesmo após a sua saída (132-134). O mesmo fenômeno já foi demonstrado com o uso de cisplatina, onde o infiltrado celular renal se inicia 1h após uso da medicação, com pico em 12h e declínio 24h após a infusão da cisplatina. O aumento das citocinas pró-inflamatórias, especialmente de TNF- α , no entanto não acompanha a mesma velocidade de queda, e permanece elevado por um período mais prolongado (135). No nosso estudo avaliamos infiltrado de células imunes no tecido renal no sétimo dia após IAM. É possível que não tenhamos observado alterações tão intensas por esta não ser a melhor janela de mobilização celular renal neste modelo estudado.

O impacto da ativação de reflexos neurais no tratamento de doenças renais e hipertensão arterial começou ser alvo de investigação recentemente (76). A inervação direta do rim, por neurônios aferentes e eferentes, pode ter um papel na resposta inflamatória em várias doenças, seja localmente ou fornecendo *feedback* para regiões do sistema nervoso central que são importantes na via do reflexo inflamatório. O aumento do impulso simpático para o rim tem um papel importante na patogênese da hipertensão e da fibrose renal. A melhor definição dessas vias pode possibilitar estímulo ou inibição neuronal seletivas, assim o uso da neuroimuno modulação renal pode fornecer novas estratégias terapêuticas, mais eficazes que a denervação renal, para tratamento não só da HAS como também de outras doenças renais que tenham um mecanismo inflamatório envolvido.

Apesar do papel crítico da inflamação na patogênese da lesão renal aguda, poucos estudos abordaram o papel do nervo vago ou da via reflexa inflamatória nesse cenário. Em modelos distintos de lesão renal aguda em roedores, o pré-tratamento com nicotina ou e a administração do análogo da nicotina GTS-21 atenuaram a injúria renal na isquemia-reperfusão (136) e também após sépsis (137), sugerindo que os receptores nicotínicos de acetilcolina podem mediar uma resposta anti-inflamatória que se segue a uma lesão renal. Alguns estudos pré-clínicos de estimulação do nervo vago (138) com aplicação de ultrassom pulsado (76, 139) também corroboram as evidências de um papel do reflexo anti-inflamatório colinérgico na proteção contra lesão renal

aguda (140). Para que haja essa proteção é fundamental não só a presença do baço, mas como também a presença dos esplenócitos com receptores α -7 nicotínicos.

A lesão renal aguda tem um papel importante na determinação do possível sucesso após um transplante de órgãos. Como a morte cerebral do doador resulta em uma liberação de mediadores pró-inflamatórios e em um aumento nas moléculas de adesão, isso leva à inflamação e lesão em órgãos periféricos, inclusive no rim, mesmo antes do transplante (141). Esse meio inflamatório no doador falecido poderia, portanto, contribuir para a redução da sobrevida do enxerto no receptor. Hoeger e colaboradores mostraram que, em ratos, a estimulação do nervo vago atenuou a resposta pró-inflamatória (aumento nos níveis séricos de TNF- α e na expressão de genes pró-inflamatórios no intestino delgado, fígado, rins e coração) durante a morte encefálica (142). A estimulação vagal de ratos doadores com morte cerebral antes do transplante renal, por sua vez, resultou em melhora na sobrevida do receptor e do órgão transplantado (141). Estes achados sugerem que a estimulação vagal possa ter um papel protetor na inflamação renal desencadeada pela morte encefálica.

Evidências anatômicas e fisiológicas sugerem que a inervação renal também tem papel na regulação tanto da imunidade quanto da inflamação renais. Os circuitos neurais, incluindo a inervação aferente e eferente do rim, fornecem vias para a regulação da função e de estados patológicos renais pelo sistema nervoso periférico, com “feedback” no rim e provavelmente no SNC (143, 144). Desta forma, existem outras vias além dos reflexos inflamatórios (do qual o reflexo colinérgico anti-inflamatório faz parte) associados à modulação da resposta à lesão renal aguda (76).

Nosso estudo foi o primeiro a demonstrar uma modulação da mobilização de linfócitos T CD4⁺ para o tecido renal relacionada ao aumento da atividade vagal pela administração de PI.

Efeitos da PI na expressão de m-RNA das citocinas em tecido renal

Para melhor compreendermos o papel das citocinas é interessante fazer um breve resumo sobre a sua etiologia. Os linfócitos T CD4⁺ efetores, se subdividem em 4 principais subgrupos, cada qual com um papel e perfil de citocinas produzidas diferentes com algumas sobreposições. Todos os linfócitos T CD4⁺ se originam dos linfócitos Th0 (naive) e a depender dos estímulos do sistema imune inato aos quais são expostos se diferenciam em Th1, Th2, Th17 e Treg (reguladores) (38, 39). Nos últimos anos, a divisão de função, antes rígida, entre esses subtipos está mais flexível devido aos relatos de plasticidade entre os subgrupos (37, 39). Tradicionalmente, o perfil Th1 é impulsionado pelas citocinas IL-12 e IFN- γ , e esse tipo celular induz por sua vez, além da produção do próprio IFN- γ , a produção de TNF- α , IL1- β e IL-10 (essa última em pequenas quantidades, promovendo uma retroalimentação negativa), dentre as citocinas estudadas no presente trabalho. A diferenciação em Th2 é estimulada pela citocina IL-4, essas células produzem então além da IL-4, as IL-6, IL-10 e IL-13, do perfil de citocinas aqui avaliadas. Quando olhamos o subgrupo Th17, temos as seguintes interleucinas envolvidas em sua diferenciação: IL-1, IL-6 e TGF- β . Já a principal citocina produzida por este perfil celular é a própria IL-17, alvo do nosso estudo. Já o perfil celular Treg produz IL-10 e TGF- β , e sua diferenciação é estimulada pela IL-2 e pelo TGF- β (37-39).

Quanto a avaliação das citocinas em tecido renal, observamos, no presente estudo, um significativo aumento da expressão de mRNA das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α em tecido renal após o IAM evidenciando uma possível ativação da via Th1 e Treg neste cenário. Este resultado era esperado, uma vez que o IAM sabidamente desencadeia inflamação renal, um dos mecanismos envolvidos na etiologia da síndrome cardiorrenal (4, 10, 145, 146). Já as outras citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células Th2 e Th17 como IL-6 e IL-17A não mostraram aumento da sua expressão quando avaliadas 7 dias após o IAM. A expressão gênica da IL-10 e IL-13 também não foi significativamente diferente no grupo IAM quando comparado ao SHAM, como ambas possuem perfis anti-inflamatórios e fazem parte dos perfis Th2 e Treg, assim sendo o resultado está de acordo com o previsto.

A potencial ativação das vias Th1 e Treg não foi relacionada ao aumento do número de macrófagos ou linfócitos no tecido renal, nem a modificações na relação entre as subpopulações dessas células (M1/M2 e linfócitos T totais/T CD4⁺) após 7 dias do IAM. Os mecanismos que levaram a esta reposta em seguida ao IAM podem estar relacionados com aumento da atividade simpática e estimulação do SRAA, que sabidamente, aumentam a lesão renal por diferentes mecanismos (45, 147, 148). A angiotensina II induz a diferenciação de células imunes e o aumento de citocinas pró-inflamatórias, ambos contribuindo para a elevação da pressão arterial. As citocinas pró-inflamatórias, por sua vez, atuam na regulação da produção de AGT no fígado e no rim, esse “feedback” positivo perpetua esse mecanismo inflamatório (45). Pacientes com SCR têm níveis circulantes aumentados de renina com produção de angiotensina II, levando a constrição arteriolar e aumento de pressão venosa. A ativação persistente do SRAA confere aos pacientes com SCR um pior prognóstico (149). Um exemplo claro da associação entre as citocinas e o SRAA é o aumento de IL-17A, extensamente associada a HAS, induzido pela angiotensina II (150). No entanto, no nosso modelo a IL-17A não teve aumento na sua expressão nos ratos infartados, embora tenha papel pró-inflamatório importante no coração após o IAM (36, 151) e como descrito acima tenha grande associação a manutenção do quadro inflamatório.

A liberação de IL-1 β é estimulada pelo inflamossoma e pela morte celular, que são elementos centrais na inflamação renal e nas suas consequências sistêmicas (152). O TNF- α também é uma citocina pró-inflamatória chave e está envolvida em diversas doenças renais (46, 47). O TNF- α e a IL-6 estimulam a migração de células inflamatórias para o rim (48). O presente estudo mostra que o IAM causou um aumento na expressão mRNA de TNF- α e IL-1 β no rim, diferente do que ocorreu com a IL-6 que não apresentou elevação depois do IAM, diferente do que foi mostrado em outro estudo no qual o IAM causou o aumento da expressão gênica renal de IL-6 em ratos normotensos (67). A IL-6 embora também se apresenta como uma interleucina pró-inflamatória é produzida pelo perfil celular Th2, que não parece ter sido ativado pelo IAM no modelo utilizado.

O TGF- β apresentou um aumento na sua expressão gênica renal após o IAM. Esta citocina está envolvida na inflamação e indução de fibrose não só em modelos de lesão renal aguda, como também em outros modelos de doença renal, sendo a principal citocina no desenvolvimento da DRC (49, 51-54). Nosso resultado está de acordo com já mostrado na literatura onde o TGF- β já foi implicado na lesão renal na síndrome cardiorenal (67, 153). Em outros tecidos, ou até mesmo no tecido renal o TGF- β pode, no entanto, desempenhar um papel anti-inflamatório, já que ele é capaz de funcionar como um regulador bifuncional que atua inibindo ou estimulando proliferação celular (51, 154).

O MCP-1 é produzido por uma variedade de células, desde células musculares lisas, leucócitos, células endoteliais e fibroblastos, em resposta a LDL oxidada e citocinas pró-inflamatórias, é uma quimiocina responsável pela migração de monócitos para os sítios inflamatórios (55, 155) e também, por estimular a liberação de monócitos pela medula óssea (154). O MCP-1/CCL-2 apresenta-se em níveis elevados em ratos SHR, com sugestivo envolvimento na etiologia da HAS nesse modelo animal (56, 155). No presente estudo não foi possível mostrar aumento do MCP-1/CCL-2 induzido pelo IAM, talvez porque nesse modelo animal o MCP-1/CCL-2 já se encontre aumentado mesmo antes da indução do IAM.

A administração de inibidores de acetilcolinesterase, por sua vez, tem se mostrado capaz de diminuir os níveis de citocinas pró-inflamatórias em vários modelos experimentais de inflamação (156). Especificamente a piridostigmina e o donepezil se mostraram capazes em reduzir os níveis plasmáticos de TNF- α , IL-6 e IFN- γ em ratos SHR (93). A estimulação colinérgica através da denervação renal também causou uma diminuição de IL-1 β e TNF- α , porém nem sempre de uma maneira sustentada (125, 157). A diminuição desses componentes inflamatórios é fundamental para prevenir a hipertrofia cardíaca e a lesão renal no contexto da síndrome cardiorenal (146), evitando assim algumas das complicações mais frequentes após o IAM. A IL-6, por sua vez, não se mostrou modificada pelo IAM ou após o uso de PI.

Aqui conseguimos demonstrar que a ativação da via anti-inflamatória colinérgica, através do tratamento com PI, foi capaz de aumentar a expressão gênica da IL-10 e IL-13, decorrente de uma estimulação das células

Th2. A IL-10 é sabidamente uma interleucina com características anti-inflamatórias. Trabalhos anteriores da literatura demonstraram esse perfil em diferentes modelos de doenças renais, inclusive em modelo de isquemia/reperfusão com diminuição de citocinas pró-inflamatórias, provavelmente por induzir um “downregulation” dos linfócitos Th17 (64-66). Estudo anterior mostrou efeito semelhante quando promoveu uma estimulação colinérgica através da denervação renal com consequente aumento de IL-10 (157). A IL-10 é essencial para a manutenção da integridade da camada epitelial e facilita a cicatrização tecidual (158). Assim, o aumento da IL-10 associada ao uso de PI é mais uma forma de reafirmar o efeito anti-inflamatório dessa via com consequente melhoria das lesões renais associada a SCR. A IL-13, também proveniente das células Th2, é importante na recuperação da lesão renal aguda por polarizar os macrófagos/células dendríticas para um perfil M2, como estudado no presente trabalho (41). O tratamento com PI foi capaz de restaurar os níveis da expressão do RNAm desta interleucina no rim após o IAM neste modelo estudado, porém este efeito não foi seguido por um aumento no infiltrado de células M2 no tecido renal, quando avaliado 7 dias após o IAM. Já foi demonstrado que a terapia genética com IL-13 atenuou a lesão renal de isquemia/reperfusão em ratos, isso pode ser útil em reduzir a inflamação e o dano túbulo-intersticial. Mostra-se, assim, mais uma vez o efeito protetor da estimulação colinérgica, provavelmente atribuído a estimulação dos perfis celulares Th2 e Treg. Com essa modulação fica evidente o poder anti-inflamatório dessa via e a poder-se-ia propor o uso de PI para fins terapêuticos focando a disfunção renal.

De forma intrigante a PI aumentou a expressão gênica de MCP-1/CCL-2, sem relação com aumento de macrófagos. Outro estudo obteve resultado semelhante ao nosso com a estimulação nicotínica em ratos SHR levando a um aumento de MCP-1 renal, o que não ocorreu em ratos WKY (63). Novamente, uma possível explicação para esse evento discutível seria a disfunção autonômica desse modelo de HAS (95). Alguns estudos foram conduzidos com uso de inibidores de MCP-1 no tratamento de doenças inflamatórias renais com melhora da doença (159), reforçando o papel inflamatório dessa citocina nas lesões renais.

Quanto a avaliação da IL-17A, nosso estudo mostra que o tratamento com PI aumenta significativamente os níveis de expressão de mRNA de IL-17A no rim. Citocina essa reconhecida como efetora das células Th17, associada a inflamação na HAS, nas doenças renais e autoimunes (35, 57-59, 63). No nosso estudo, o uso da PI parece ter estimulado as células Th17. Sobre o efeito da estimulação colinérgica sobre a IL-17A existem pouquíssimos dados na literatura, principalmente em ratos SHR. O seu papel pró-inflamatório na HAS induzida por angiotensina II (60-62), pode estar muito associado ao desenvolvimento de HAS nos ratos SHR. Estudos *in vitro* mostraram que a estimulação colinérgica através do receptor nicotínico diminuíram a secreção de IL-17 e a estimulação muscarínica aumentou a sua secreção em modelo murino (160). Esses resultados podem não ter sido reproduzidos em nosso trabalho exatamente por conta da perda da auto regulação da linhagem animal estudada (97).

O aumento da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias, após a ativação do sistema imune inato, pode desencadear então uma cascata de eventos tais como a produção de mais citocinas pró-inflamatórias, ativação do SRAA, ativação e migração de células imunes, com uma amplificação de resposta imune não só local, mas também sistêmica. Essa resposta, quando não modulada, levará a curto, médio e longo prazos a uma injúria renal. Desta forma, é fundamental encontrarmos estratégias terapêuticas capazes de minimizar esses efeitos, o uso da piridostigmina tem se mostrado extremamente promissor nesse cenário.

Estudos anteriores mostraram uma modulação anti-inflamatória nicotínica/colinérgica do sistema imunológico inato em ratos WKY, porém não demonstraram o mesmo em ratos SHR (63, 95, 111). Nosso grupo e outros têm estudado a modulação colinérgica anti-inflamatória usando PI em ratos WKY com modulação do sistema imunológico no coração (81, 88, 90, 161).

São necessários mais estudos em ratos da linhagem SHR para entender plenamente suas vias inflamatórias e anti-inflamatórias assim como quais são os seus gatilhos específicos e respostas às diferentes formas de intervenção. Uma vez que esses ratos apresentam comportamento por vezes

diferente dos ratos normotensos quando submetidos, por exemplo, à estimulação colinérgica.

Em suma, podemos observar a partir dos dados obtidos neste estudo, que a estimulação colinérgica foi eficiente em modular as vias Th1/Th2, diminuir a expressão gênica de algumas citocinas pró-inflamatórias e de aumentar a expressão das citocinas com perfil anti-inflamatório no tecido renal em ratos SHR.

6. Conclusões

Nesse estudo foi possível comprovar que o uso precoce de piridostigmina após o IAM foi capaz de melhorar a resposta autonômica, reverter alterações morfofuncionais do coração e reduzir a expressão gênica de citocinas pró-inflamatória em ratos SHR e aumentar a expressão gênica de citocinas anti-inflamatórias. Estes resultados apoiam a ativação do sistema colinérgico como um potencial alvo farmacológico adjuvante no tratamento no IAM e suas consequências, em especial na síndrome cardiorrenal.

7. Referências Bibliográficas

1. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2020;141(9):e139-e596.
2. Jokinen E. Obesity and cardiovascular disease. *Minerva Pediatr*. 2015;67(1):25-32.
3. 2020. Available from: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205&id=6937&VObj=htp://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defctohtm.exe?sim/cnv/obt10>.
4. Clementi A, Virzi GM, Battaglia GG, Ronco C. Neurohormonal, Endocrine, and Immune Dysregulation and Inflammation in Cardiorenal Syndrome. *Cardiorenal Med*. 2019;9(5):265-73.
5. Sesso RC, Lopes AA, Thome FS, Lugon JR, Martins CT. Brazilian Chronic Dialysis Survey 2016. *J Bras Nefrol*. 2017;39(3):261-6.
6. Barreto SM, Ladeira RM, Duncan BB, Schmidt MI, Lopes AA, Bensenor IM, et al. Chronic kidney disease among adult participants of the ELSA-Brasil cohort: association with race and socioeconomic position. *J Epidemiol Community Health*. 2016;70(4):380-9.
7. Luciano Ede P, Luconi PS, Sesso RC, Melaragno CS, Abreu PF, Reis SF, et al. Prospective study of 2151 patients with chronic kidney disease under conservative treatment with multidisciplinary care in the Vale do Paraiba, SP. *J Bras Nefrol*. 2012;34(3):226-34.
8. Coresh J, Astor BC, Greene T, Eknoyan G, Levey AS. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis*. 2003;41(1):1-12.
9. Bock JS, Gottlieb SS. Cardiorenal syndrome: new perspectives. *Circulation*. 2010;121(23):2592-600.
10. Ronco C, Di Lullo L. Cardiorenal syndrome. *Heart Fail Clin*. 2014;10(2):251-80.
11. Bocchi EA, Arias A, Verdejo H, Diez M, Gomez E, Castro P, et al. The reality of heart failure in Latin America. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(11):949-58.

12. Stevens PE, Levin A, Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease Guideline Development Work Group M. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med.* 2013;158(11):825-30.
13. Smith GL, Lichtman JH, Bracken MB, Shlipak MG, Phillips CO, DiCapua P, et al. Renal impairment and outcomes in heart failure: systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(10):1987-96.
14. Heywood JT, Fonarow GC, Costanzo MR, Mathur VS, Wigneswaran JR, Wynne J, et al. High prevalence of renal dysfunction and its impact on outcome in 118,465 patients hospitalized with acute decompensated heart failure: a report from the ADHERE database. *J Card Fail.* 2007;13(6):422-30.
15. Damman K, Navis G, Voors AA, Asselbergs FW, Smilde TD, Cleland JG, et al. Worsening renal function and prognosis in heart failure: systematic review and meta-analysis. *J Card Fail.* 2007;13(8):599-608.
16. Fox KA, Dabbous OH, Goldberg RJ, Pieper KS, Eagle KA, Van de Werf F, et al. Prediction of risk of death and myocardial infarction in the six months after presentation with acute coronary syndrome: prospective multinational observational study (GRACE). *BMJ.* 2006;333(7578):1091.
17. Pimenta E, Ramos RF, Gun C, Santos ES, Timerman A, Piegas LS. [Renal function outcome in acute myocardial infarction as a prognostic factor of in-hospital events and at one-year follow-up]. *Arq Bras Cardiol.* 2006;86(3):170-4.
18. van Rijn MHC, Metzger M, Flamant M, Houillier P, Haymann JP, van den Brand J, et al. Performance of creatinine-based equations for estimating glomerular filtration rate changes over time. *Nephrol Dial Transplant.* 2020;35(5):819-27.
19. Hatamizadeh P, Fonarow GC, Budoff MJ, Darabian S, Kovesdy CP, Kalantar-Zadeh K. Cardiorenal syndrome: pathophysiology and potential targets for clinical management. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9(2):99-111.
20. Kazory A. Emergence of blood urea nitrogen as a biomarker of neurohormonal activation in heart failure. *Am J Cardiol.* 2010;106(5):694-700.

21. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mezzano S, et al. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int Suppl.* 2002(82):S12-22.
22. Yan X, Anzai A, Katsumata Y, Matsushashi T, Ito K, Endo J, et al. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;62:24-35.
23. Abbas AKL, Andrew H.; Pillai, S. *Imunologia celular e molecular.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.
24. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 2002;296(5566):301-5.
25. Patel S. Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): the Derivatives and Triggers of Inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2018;18(11):63.
26. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol.* 1997;9(1):4-9.
27. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2018;281(1):8-27.
28. Chen G, Shaw MH, Kim YG, Nunez G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:365-98.
29. Langefeld T, Mohamed W, Ghai R, Chakraborty T. Toll-like receptors and NOD-like receptors: domain architecture and cellular signalling. *Adv Exp Med Biol.* 2009;653:48-57.
30. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683-765.
31. Blum A, Yeganeh S. The role of T-lymphocyte subpopulations in acute myocardial infarction. *Eur J Intern Med.* 2003;14(7):407-10.
32. Steppich BA, Moog P, Matissek C, Wisniowski N, Kuhle J, Joghetaei N, et al. Cytokine profiles and T cell function in acute coronary syndromes. *Atherosclerosis.* 2007;190(2):443-51.
33. Gee K, Guzzo C, Che Mat NF, Ma W, Kumar A. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2009;8(1):40-52.
34. Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell.* 2010;140(6):845-58.

35. Cortvrindt C, Speeckaert R, Moerman A, Delanghe JR, Speeckaert MM. The role of interleukin-17A in the pathogenesis of kidney diseases. *Pathology*. 2017;49(3):247-58.
36. Zhou SF, Yuan J, Liao MY, Xia N, Tang TT, Li JJ, et al. IL-17A promotes ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Mol Med (Berl)*. 2014;92(10):1105-16.
37. Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*. 2009;30(5):646-55.
38. Mucida D, Cheroutre H. The many face-lifts of CD4 T helper cells. *Adv Immunol*. 2010;107:139-52.
39. Zygmunt B, Veldhoen M. T helper cell differentiation more than just cytokines. *Adv Immunol*. 2011;109:159-96.
40. Hofmann U, Knorr S, Vogel B, Weirather J, Frey A, Ertl G, et al. Interleukin-13 deficiency aggravates healing and remodeling in male mice after experimental myocardial infarction. *Circ Heart Fail*. 2014;7(5):822-30.
41. Zhang MZ, Wang X, Wang Y, Niu A, Wang S, Zou C, et al. IL-4/IL-13-mediated polarization of renal macrophages/dendritic cells to an M2a phenotype is essential for recovery from acute kidney injury. *Kidney Int*. 2017;91(2):375-86.
42. Bilate AM, Lafaille JJ. Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:733-58.
43. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*. 2000;101(5):455-8.
44. Jung M, Ma Y, Iyer RP, DeLeon-Pennell KY, Yabluchanskiy A, Garrett MR, et al. IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. *Basic Res Cardiol*. 2017;112(3):33.
45. Satou R, Penrose H, Navar LG. Inflammation as a Regulator of the Renin-Angiotensin System and Blood Pressure. *Curr Hypertens Rep*. 2018;20(12):100.
46. Gomez-Guerrero C, Lopez-Armada MJ, Gonzalez E, Egido J. Soluble IgA and IgG aggregates are catabolized by cultured rat mesangial cells and induce production of TNF-alpha and IL-6, and proliferation. *J Immunol*. 1994;153(11):5247-55.

47. Jevnikar AM, Brennan DC, Singer GG, Heng JE, Maslinski W, Wuthrich RP, et al. Stimulated kidney tubular epithelial cells express membrane associated and secreted TNF alpha. *Kidney Int.* 1991;40(2):203-11.
48. Radeke HH, Meier B, Topley N, Floge J, Habermehl GG, Resch K. Interleukin 1-alpha and tumor necrosis factor-alpha induce oxygen radical production in mesangial cells. *Kidney Int.* 1990;37(2):767-75.
49. Chung S, Overstreet JM, Li Y, Wang Y, Niu A, Wang S, et al. TGF-beta promotes fibrosis after severe acute kidney injury by enhancing renal macrophage infiltration. *JCI Insight.* 2018;3(21).
50. Rodrigues-Diez R, Rayego-Mateos S, Orejudo M, Aroeira LS, Selgas R, Ortiz A, et al. TGF-Beta Blockade Increases Renal Inflammation Caused by the C-Terminal Module of the CCN2. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:506041.
51. Lan HY. Diverse roles of TGF-beta/Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci.* 2011;7(7):1056-67.
52. Kim TW, Kim YJ, Seo CS, Kim HT, Park SR, Lee MY, et al. *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hylander attenuates renal inflammation and interstitial fibrosis via regulation of TGF-ss and Smad3 expression on unilateral ureteral obstruction rat model. *Phytomedicine.* 2016;23(4):331-9.
53. Lu S, Fan HW, Li K, Fan XD. Suppression of Elp2 prevents renal fibrosis and inflammation induced by unilateral ureter obstruction (UUO) via inactivating Stat3-regulated TGF-beta1 and NF-kappaB pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;501(2):400-7.
54. Gewin LS. Transforming Growth Factor-beta in the Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease Transition. *Nephron.* 2019;143(3):154-7.
55. Gao J, Liu X, Wei L, Niu D, Wei J, Wang L, et al. Genetic variants of MCP-1 and CCR2 genes and IgA nephropathy risk. *Oncotarget.* 2016;7(47):77950-7.
56. Santisteban MM, Ahmari N, Carvajal JM, Zingler MB, Qi Y, Kim S, et al. Involvement of bone marrow cells and neuroinflammation in hypertension. *Circ Res.* 2015;117(2):178-91.
57. Caillon A, Schiffrin EL. Role of Inflammation and Immunity in Hypertension: Recent Epidemiological, Laboratory, and Clinical Evidence. *Curr Hypertens Rep.* 2016;18(3):21.

58. Solak Y, Afsar B, Vaziri ND, Aslan G, Yalcin CE, Covic A, et al. Hypertension as an autoimmune and inflammatory disease. *Hypertens Res.* 2016;39(8):567-73.
59. von Vietinghoff S, Ley K. Interleukin 17 in vascular inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21(6):463-9.
60. Madhur MS, Lob HE, McCann LA, Iwakura Y, Blinder Y, Guzik TJ, et al. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension.* 2010;55(2):500-7.
61. Norlander AE, Saleh MA, Kamat NV, Ko B, Gnecco J, Zhu L, et al. Interleukin-17A Regulates Renal Sodium Transporters and Renal Injury in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Hypertension.* 2016;68(1):167-74.
62. Saleh MA, Norlander AE, Madhur MS. Inhibition of Interleukin 17-A but not Interleukin-17F Signaling Lowers Blood Pressure and Reduces End-organ Inflammation in Angiotensin II-induced Hypertension. *JACC Basic Transl Sci.* 2016;1(7):606-16.
63. Harwani SC, Ratcliff J, Sutterwala FS, Ballas ZK, Meyerholz DK, Chapleau MW, et al. Nicotine Mediates CD161a+ Renal Macrophage Infiltration and Premature Hypertension in the Spontaneously Hypertensive Rat. *Circ Res.* 2016;119(10):1101-15.
64. Diefenhardt P, Nosko A, Kluger MA, Richter JV, Wegscheid C, Kobayashi Y, et al. IL-10 Receptor Signaling Empowers Regulatory T Cells to Control Th17 Responses and Protect from GN. *J Am Soc Nephrol.* 2018;29(7):1825-37.
65. Thorenz A, Derlin K, Schroder C, Dressler L, Vijayan V, Pradhan P, et al. Enhanced activation of interleukin-10, heme oxygenase-1, and AKT in C5aR2-deficient mice is associated with protection from ischemia reperfusion injury-induced inflammation and fibrosis. *Kidney Int.* 2018;94(4):741-55.
66. Mu W, Ouyang X, Agarwal A, Zhang L, Long DA, Cruz PE, et al. IL-10 suppresses chemokines, inflammation, and fibrosis in a model of chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(12):3651-60.
67. Lekawanvijit S, Kompa AR, Zhang Y, Wang BH, Kelly DJ, Krum H. Myocardial infarction impairs renal function, induces renal interstitial fibrosis, and increases renal KIM-1 expression: implications for cardiorenal syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302(9):H1884-93.

68. Wahl P, Wolf M. FGF23 in chronic kidney disease. *Adv Exp Med Biol.* 2012;728:107-25.
69. Strom TB, Deisseroth A, Morganroth J, Carpenter CB, Merrill JP. Alteration of the cytotoxic action of sensitized lymphocytes by cholinergic agents and activators of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972;69(10):2995-9.
70. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature.* 2002;420(6917):853-9.
71. Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med.* 2004;10(11):1216-21.
72. Tsoyi K, Jang HJ, Kim JW, Chang HK, Lee YS, Pae HO, et al. Stimulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by nicotine attenuates inflammatory response in macrophages and improves survival in experimental model of sepsis through heme oxygenase-1 induction. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(11):2057-70.
73. Rosas-Ballina M, Tracey KJ. The neurology of the immune system: neural reflexes regulate immunity. *Neuron.* 2009;64(1):28-32.
74. Huston JM. The vagus nerve and the inflammatory reflex: wandering on a new treatment paradigm for systemic inflammation and sepsis. *Surg Infect (Larchmt).* 2012;13(4):187-93.
75. Tracey KJ. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(6):418-28.
76. Okusa MD, Rosin DL, Tracey KJ. Targeting neural reflex circuits in immunity to treat kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(11):669-80.
77. Mravec B. [The inflammatory reflex: the role of the vagus nerve in regulation of immune functions]. *Cesk Fysiol.* 2011;60(2):57-69.
78. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature.* 2000;405(6785):458-62.
79. Rosas-Ballina M, Tracey KJ. Cholinergic control of inflammation. *J Intern Med.* 2009;265(6):663-79.
80. Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdes-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C, et al. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science.* 2011;334(6052):98-101.

81. Soares PP, da Nobrega AC, Ushizima MR, Irigoyen MC. Cholinergic stimulation with pyridostigmine increases heart rate variability and baroreflex sensitivity in rats. *Auton Neurosci*. 2004;113(1-2):24-31.
82. Tang TT, Yuan J, Zhu ZF, Zhang WC, Xiao H, Xia N, et al. Regulatory T cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2012;107(1):232.
83. Pavlov VA, Ochani M, Gallowitsch-Puerta M, Ochani K, Huston JM, Czura CJ, et al. Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(13):5219-23.
84. Parrish WR, Rosas-Ballina M, Gallowitsch-Puerta M, Ochani M, Ochani K, Yang LH, et al. Modulation of TNF release by choline requires alpha7 subunit nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling. *Mol Med*. 2008;14(9-10):567-74.
85. Czura CJ, Friedman SG, Tracey KJ. Neural inhibition of inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. *J Endotoxin Res*. 2003;9(6):409-13.
86. Pavlov VA, Tracey KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav Immun*. 2005;19(6):493-9.
87. Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest*. 2007;117(2):289-96.
88. Bezerra OC, Franca CM, Rocha JA, Neves GA, Souza PRM, Teixeira Gomes M, et al. Cholinergic Stimulation Improves Oxidative Stress and Inflammation in Experimental Myocardial Infarction. *Sci Rep*. 2017;7(1):13687.
89. Feriani DJ, Souza GIH, Carrozzi NM, Mostarda C, Dourado PMM, Consolim-Colombo FM, et al. Impact of exercise training associated to pyridostigmine treatment on autonomic function and inflammatory profile after myocardial infarction in rats. *Int J Cardiol*. 2017;227:757-65.
90. Rocha JA, Ribeiro SP, Franca CM, Coelho O, Alves G, Lacchini S, et al. Increase in cholinergic modulation with pyridostigmine induces anti-inflammatory cell recruitment soon after acute myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2016;310(8):R697-706.
91. Rodrigues B, Lira FS, Consolim-Colombo FM, Rocha JA, Caperuto EC, De Angelis K, et al. Role of exercise training on autonomic changes and

inflammatory profile induced by myocardial infarction. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:702473.

92. Sadis C, Teske G, Stokman G, Kubjak C, Claessen N, Moore F, et al. Nicotine protects kidney from renal ischemia/reperfusion injury through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *PLoS One.* 2007;2(5):e469.

93. Lataro RM, Silva CA, Fazan R, Jr., Rossi MA, Prado CM, Godinho RO, et al. Increase in parasympathetic tone by pyridostigmine prevents ventricular dysfunction during the onset of heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013;305(8):R908-16.

94. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J.* 1963;27:282-93.

95. Harwani SC, Chapleau MW, Legge KL, Ballas ZK, Abboud FM. Neurohormonal modulation of the innate immune system is proinflammatory in the prehypertensive spontaneously hypertensive rat, a genetic model of essential hypertension. *Circ Res.* 2012;111(9):1190-7.

96. Salgado HC, Barale AR, Castania JA, Machado BH, Chapleau MW, Fazan R, Jr. Baroreflex responses to electrical stimulation of aortic depressor nerve in conscious SHR. 2007;292(1):H593-600.

97. Hultstrom M. Development of structural kidney damage in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2012;30(6):1087-91.

98. Ruparelina N, Digby JE, Jefferson A, Medway DJ, Neubauer S, Lygate CA, et al. Myocardial infarction causes inflammation and leukocyte recruitment at remote sites in the myocardium and in the renal glomerulus. *Inflamm Res.* 2013;62(5):515-25.

99. Linhart C, Ulrich C, Greinert D, Dambeck S, Wienke A, Girndt M, et al. Systemic inflammation in acute cardiorenal syndrome: an observational pilot study. *ESC Heart Fail.* 2018;5(5):920-30.

100. Abboud FM, Harwani SC, Chapleau MW. Autonomic neural regulation of the immune system: implications for hypertension and cardiovascular disease. *Hypertension.* 2012;59(4):755-62.

101. Kieran NE, Rabb H. Immune responses in kidney preservation and reperfusion injury. *J Investig Med.* 2004;52(5):310-4.

102. Libby P, Nahrendorf M, Swirski FK. Leukocytes Link Local and Systemic Inflammation in Ischemic Cardiovascular Disease: An Expanded "Cardiovascular Continuum". *J Am Coll Cardiol*. 2016;67(9):1091-103.
103. Hoskin JL, Al-Hasan Y, Sabbagh MN. Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists for the Treatment of Alzheimer's Dementia: An Update. *Nicotine Tob Res*. 2019;21(3):370-6.
104. Bonaz B, Sinniger V, Pellissier S. Vagus nerve stimulation: a new promising therapeutic tool in inflammatory bowel disease. *J Intern Med*. 2017;282(1):46-63.
105. de La Fuente RN, Rodrigues B, Moraes-Silva IC, Souza LE, Sirvente R, Mostarda C, et al. Cholinergic stimulation with pyridostigmine improves autonomic function in infarcted rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013;40(9):610-6.
106. Behling A, Moraes RS, Rohde LE, Ferlin EL, Nobrega AC, Ribeiro JP. Cholinergic stimulation with pyridostigmine reduces ventricular arrhythmia and enhances heart rate variability in heart failure. *Am Heart J*. 2003;146(3):494-500.
107. Serra SM, Costa RV, Teixeira De Castro RR, Xavier SS, Nobrega AC. Cholinergic stimulation improves autonomic and hemodynamic profile during dynamic exercise in patients with heart failure. *J Card Fail*. 2009;15(2):124-9.
108. Barboza CA, Fukushima AR, Carrozzi N, Machi JF, Dourado PMM, Mostarda CT, et al. Cholinergic Stimulation by Pyridostigmine Bromide Before Myocardial Infarction Prevent Cardiac and Autonomic Dysfunction. *Sci Rep*. 2019;9(1):2481.
109. Rodriguez-Iturbe B, Pons H, Johnson RJ. Role of the Immune System in Hypertension. *Physiol Rev*. 2017;97(3):1127-64.
110. Lataro RM, Silva CA, Tefe-Silva C, Prado CM, Salgado HC. Acetylcholinesterase Inhibition Attenuates the Development of Hypertension and Inflammation in Spontaneously Hypertensive Rats. *Am J Hypertens*. 2015;28(10):1201-8.
111. Bui LM, Keen CL, Dubick MA. Comparative effects of 6-week nicotine treatment on blood pressure and components of the antioxidant system in male spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive Wistar Kyoto (WKY) rats. *Toxicology*. 1995;98(1-3):57-63.

112. Calvillo L, Vanoli E, Andreoli E, Besana A, Omodeo E, Gnechi M, et al. Vagal stimulation, through its nicotinic action, limits infarct size and the inflammatory response to myocardial ischemia and reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011;58(5):500-7.
113. Gibbons CH. Basics of autonomic nervous system function. *Handb Clin Neurol.* 2019;160:407-18.
114. Wehrwein EA, Orer HS, Barman SM. Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. *Compr Physiol.* 2016;6(3):1239-78.
115. La Rovere MT, Bigger JT, Jr., Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. *Lancet.* 1998;351(9101):478-84.
116. Lataro RM, Silva MAB, Mestriner FL, Cau SBA, Tostes RCA, Salgado HC. Chronic Treatment With Acetylcholinesterase Inhibitors Attenuates Vascular Dysfunction in Spontaneously Hypertensive Rats. *Am J Hypertens.* 2019;32(6):579-87.
117. Norton GR, Veliotis DG, Osadchii O, Woodiwiss AJ, Thomas DP. Susceptibility to systolic dysfunction in the myocardium from chronically infarcted spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294(1):H372-8.
118. Ravingerova T, Bernatova I, Matejikova J, Ledvenyiova V, Nemcekova M, Pechanova O, et al. Impaired cardiac ischemic tolerance in spontaneously hypertensive rats is attenuated by adaptation to chronic and acute stress. *Exp Clin Cardiol.* 2011;16(3):e23-9.
119. Cho E, Kim M, Ko YS, Lee HY, Song M, Kim MG, et al. Role of inflammation in the pathogenesis of cardiorenal syndrome in a rat myocardial infarction model. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28(11):2766-78.
120. Tang PM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15(3):144-58.
121. Cao Q, Harris DC, Wang Y. Macrophages in kidney injury, inflammation, and fibrosis. *Physiology (Bethesda).* 2015;30(3):183-94.

122. Zhang F, Liu H, Liu D, Liu Y, Li H, Tan X, et al. Effects of RAAS Inhibitors in Patients with Kidney Disease. *Curr Hypertens Rep.* 2017;19(9):72.
123. Lin YC, Chang YH, Yang SY, Wu KD, Chu TS. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *J Formos Med Assoc.* 2018;117(8):662-75.
124. Weirather J, Hofmann UD, Beyersdorf N, Ramos GC, Vogel B, Frey A, et al. Foxp3+ CD4+ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. *Circ Res.* 2014;115(1):55-67.
125. Zaldivia MT, Rivera J, Hering D, Marusic P, Sata Y, Lim B, et al. Renal Denervation Reduces Monocyte Activation and Monocyte-Platelet Aggregate Formation: An Anti-Inflammatory Effect Relevant for Cardiovascular Risk. *Hypertension.* 2017;69(2):323-31.
126. Raikwar N, Braverman C, Snyder PM, Fenton RA, Meyerholz DK, Abboud FM, et al. Renal denervation and CD161a immune ablation prevent cholinergic hypertension and renal sodium retention. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2019;317(3):H517-H30.
127. Hofmann U, Frantz S. Role of T-cells in myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2016;37(11):873-9.
128. Sharma R, Kinsey GR. Regulatory T cells in acute and chronic kidney diseases. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2018;314(5):F679-F98.
129. Martina MN, Noel S, Bandapalle S, Hamad AR, Rabb H. T lymphocytes and acute kidney injury: update. *Nephron Clin Pract.* 2014;127(1-4):51-5.
130. Monu SR, Pesce P, Sodhi K, Boldrin M, Puri N, Fedorova L, et al. HO-1 induction improves the type-1 cardiorenal syndrome in mice with impaired angiotensin II-induced lymphocyte activation. *Hypertension.* 2013;62(2):310-6.
131. Ghali JR, Wang YM, Holdsworth SR, Kitching AR. Regulatory T cells in immune-mediated renal disease. *Nephrology (Carlton).* 2016;21(2):86-96.
132. Lai LW, Yong KC, Igarashi S, Lien YH. A sphingosine-1-phosphate type 1 receptor agonist inhibits the early T-cell transient following renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* 2007;71(12):1223-31.
133. Rabb H. Immune modulation of acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(3):604-6.

134. Requião-Moura LR, Durao Junior Mde S, Matos AC, Pacheco-Silva A. Ischemia and reperfusion injury in renal transplantation: hemodynamic and immunological paradigms. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015;13(1):129-35.
135. Liu M, Chien CC, Burne-Taney M, Molls RR, Racusen LC, Colvin RB, et al. A pathophysiologic role for T lymphocytes in murine acute cisplatin nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(3):765-74.
136. Yeboah MM, Xue X, Javdan M, Susin M, Metz CN. Nicotinic acetylcholine receptor expression and regulation in the rat kidney after ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;295(3):F654-61.
137. Chatterjee PK, Yeboah MM, Dowling O, Xue X, Powell SR, Al-Abed Y, et al. Nicotinic acetylcholine receptor agonists attenuate septic acute kidney injury in mice by suppressing inflammation and proteasome activity. *PLoS One*. 2012;7(5):e35361.
138. Inoue T, Abe C, Sung SS, Moscalu S, Jankowski J, Huang L, et al. Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through $\alpha 7nAChR+$ splenocytes. *J Clin Invest*. 2016;126(5):1939-52.
139. Gigliotti JC, Huang L, Ye H, Bajwa A, Chattrabutti K, Lee S, et al. Ultrasound prevents renal ischemia-reperfusion injury by stimulating the splenic cholinergic anti-inflammatory pathway. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(9):1451-60.
140. Cai J, Nash WT, Okusa MD. Ultrasound for the treatment of acute kidney injury and other inflammatory conditions: a promising path toward noninvasive neuroimmune regulation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2020;319(1):F125-F38.
141. Hoeger S, Fontana J, Jarczyk J, Selhorst J, Waldherr R, Kramer BK, et al. Vagal stimulation in brain dead donor rats decreases chronic allograft nephropathy in recipients. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(3):544-9.
142. Hoeger S, Bergstraesser C, Selhorst J, Fontana J, Birck R, Waldherr R, et al. Modulation of brain dead induced inflammation by vagus nerve stimulation. *Am J Transplant*. 2010;10(3):477-89.
143. Nishi EE, Bergamaschi CT, Campos RR. The crosstalk between the kidney and the central nervous system: the role of renal nerves in blood pressure regulation. *Exp Physiol*. 2015;100(5):479-84.

144. Abdulla MH, Johns EJ. The innervation of the kidney in renal injury and inflammation: a cause and consequence of deranged cardiovascular control. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017;220(4):404-16.
145. Ronco C. The Cardiorenal Syndrome: Basis and Common Ground for a Multidisciplinary Patient-Oriented Therapy. *Cardiorenal Med*. 2011;1(1):3-4.
146. Moubarak M, Jabbour H, Smayra V, Chouery E, Saliba Y, Jebara V, et al. Cardiorenal syndrome in hypertensive rats: microalbuminuria, inflammation and ventricular hypertrophy. *Physiol Res*. 2012;61(1):13-24.
147. Grassi G, Bertoli S, Seravalle G. Sympathetic nervous system: role in hypertension and in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012;21(1):46-51.
148. Patel S, Rauf A, Khan H, Abu-Izneid T. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed Pharmacother*. 2017;94:317-25.
149. Mittal A, Rana S, Sharma R, Kumar A, Prasad R, Raut SK, et al. Myocardin ablation in a cardiac-renal rat model. *Sci Rep*. 2019;9(1):5872.
150. McMaster WG, Kirabo A, Madhur MS, Harrison DG. Inflammation, immunity, and hypertensive end-organ damage. *Circ Res*. 2015;116(6):1022-33.
151. Mora-Ruiz MD, Blanco-Favela F, Chavez Rueda AK, Legorreta-Haquet MV, Chavez-Sanchez L. Role of interleukin-17 in acute myocardial infarction. *Mol Immunol*. 2019;107:71-8.
152. Anders HJ. Of Inflammasomes and Alarmins: IL-1beta and IL-1alpha in Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(9):2564-75.
153. Rubattu S, Mennuni S, Testa M, Mennuni M, Pierelli G, Pagliaro B, et al. Pathogenesis of chronic cardiorenal syndrome: is there a role for oxidative stress? *Int J Mol Sci*. 2013;14(11):23011-32.
154. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF-beta and the TGF-beta Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(5).
155. Lee H, Kim KC, Hong YM. Changes of Bax, Bcl-2, CCR-2, MCP-1, and TGF-beta1 genes in the left ventricle of spontaneously hypertensive rat after losartan treatment. *Korean J Pediatr*. 2019;62(3):95-101.

156. Olofsson PS, Rosas-Ballina M, Levine YA, Tracey KJ. Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity. *Immunol Rev.* 2012;248(1):188-204.
157. Hilderman M, Qureshi AR, Abtahi F, Witt N, Jagren C, Olbers J, et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway in resistant hypertension treated with renal denervation. *Mol Med.* 2019;25(1):39.
158. Sziksz E, Pap D, Lippai R, Beres NJ, Fekete A, Szabo AJ, et al. Fibrosis Related Inflammatory Mediators: Role of the IL-10 Cytokine Family. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:764641.
159. Haller H, Bertram A, Nadrowitz F, Menne J. Monocyte chemoattractant protein-1 and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2016;25(1):42-9.
160. Qian J, Galitovskiy V, Chernyavsky AI, Marchenko S, Grando SA. Plasticity of the murine spleen T-cell cholinergic receptors and their role in in vitro differentiation of naive CD4 T cells toward the Th1, Th2 and Th17 lineages. *Genes Immun.* 2011;12(3):222-30.
161. Ulloa L. The cholinergic anti-inflammatory pathway meets microRNA. *Cell Res.* 2013;23(11):1249-50.

8. Anexos

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA NA MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO RENAL EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)", protocolada sob o CEUA nº 7612011118 (ID 000157), sob a responsabilidade de **Fernanda Marciano Consolim-Colombo** e equipe; *Maria Helena Mattos Porter Fonseca* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 19/06/2019.

We certify that the proposal "EFFECTS OF COLLINERIC STIMULATION IN MODULATING RENAL INFLAMMATION IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS (SHR)", utilizing 64 Isogenic rats (64 males), protocol number CEUA 7612011118 (ID 000157), under the responsibility of **Fernanda Marciano Consolim-Colombo** and team; *Maria Helena Mattos Porter Fonseca* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 06/19/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 07/2019 a 12/2019

Área: [Medicina](#)

Origem: [Biotério - Unidade Vergueiro](#)

Espécie: [Ratos isogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [10 a 12 semanas](#)

N: [64](#)

Linhagem: [SHR](#)

Peso: [250 a 300 g](#)

Local do experimento: Sala de experimentação localizada no próprio biotério

São Paulo, 25 de junho de 2019



Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Nove de Julho



Profa. Dra. Stella Regina Zamuner
 Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Nove de Julho