

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA

Fernando Oliveira Costa

Efeitos da estimulação colinérgica sobre aspectos
morfofuncionais do coração e metabolismo cerebral em ratos
SHR após infarto agudo do miocárdio

SÃO PAULO

2020

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA

Fernando Oliveira Costa

Efeitos da estimulação colinérgica sobre aspectos
morfofuncionais do coração e metabolismo cerebral em ratos
SHR após infarto agudo do miocárdio

Tese 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

Costa, Fernando Oliveira.

Efeitos da estimulação colinérgica sobre aspectos morfofuncionais do coração e metabolismo cerebral em ratos SHR após infarto agudo do miocárdio. / Fernando Oliveira Costa. 2020.

118 f.

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

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

1. Infarto agudo do miocárdio. 2. SHR. 3. Piridostigmina. 4. 18-FDG. 5. Expressão gênica.

Consolim-Colombo, Fernanda M.

II. Título.

CDU 616



São Paulo 20 de fevereiro de 2020

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno: **FERNANDO OLIVEIRA COSTA**

Título da tese: **EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA SOBRE ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DO CORAÇÃO E METABOLISMO CEREBRAL EM RATOS SRH APÓS INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO.**

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

Membro: PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO SILVA JÚNIOR José Antônio Silva Júnior

Membro: PROFA. DRA. IVANI CREDIDIO TROMBETTA Ivani Trombetta

Membro: PROFA. DRA. MARIA CLAUDIA COSTA IRIGOYEN Maria Claudia Costa Irigoyen

Membro: PROFA. DRA. VERA DE MOURA AZEVEDO FARAH Vera de Moura Azevedo Farah

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, sempre.

Ao Prof. Eduardo Antônio Conde Garcia, M.D., D.Sc., meu primeiro mentor em ciência. Digno do meu mais alto apreço.

A Vanessa Cristina, habilidade sem par de me trazer tranquilidade. E alegria.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Fernanda Marciano Consolim-Colombo, orientadora, pelas oportunidades e atenção para com os alunos. *Insights* poderosos.

A Tercio Lemos de Moraes, amigo, amigo, amigo! E pelas incontáveis horas discutindo e ajudando no trabalho.

À Profa. Dra. Kátia De Angelis, pelas observações muito pertinentes por ocasião da qualificação. Inteligência aguda.

À Profa. Dra. Maria Cláudia da Costa Irigoyen, pelas observações muito pertinentes por ocasião da qualificação. E por ver que a ciência tem romantismo.

Aos inumeráveis envolvidos no projeto.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação da UNINOVE.

RESUMO

COSTA, F.O. **Efeitos da estimulação colinérgica sobre aspectos morfofuncionais do coração e metabolismo cerebral em ratos SHR após infarto agudo do miocárdio.** Tese de Doutorado. São Paulo: Programa de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de “Doutor em Ciências da Saúde”. Universidade Nove de Julho (UNINOVE), 2020.

INTRODUÇÃO: O Sistema Nervoso Central (SNC) têm papel fundamental nos ajustes regulatórios neuro-humorais, inflamatórios e comportamentais que ocorrem após o infarto agudo do miocárdio (IAM). Os anticolinesterásicos, fármacos com capacidade de aumentar a modulação parassimpática e reduzir o processo inflamatório sistêmico, podem também alterar a atividade em áreas específicas do SNC e modular a resposta inflamatória miocárdica, alterando seu metabolismo, a expressão gênica de citocinas, e o seu remodelamento o após uma injúria isquêmica. **OBJETIVO:** Avaliar o efeito do brometo de piridostigmina (BP - anticolinesterásico de ação periférica) no metabolismo de diferentes áreas do SNC e do coração, quantificar a expressão de mRNA de citocinas pró e anti-inflamatórias no ventrículo esquerdo (VE) e analisar parâmetros morfo-funcionais do coração após IAM em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

MATERIAL E MÉTODOS: Ratos machos SHR, com 10-12 semanas, foram divididos em 3 grupos: grupo Sham (submetidos a toracotomia, n=14), grupo IAM (submetidos a toracotomia e ligadura da artéria coronária esquerda, n=19) e grupo IAM+PI (submetidos a toracotomia e ligadura da artéria coronária esquerda, e tratados com BP - 40mg/kg/dia por gavagem, 1 x dia, por 7 dias, n=19). No quinto dia após o IAM os animais foram anestesiados e submetidos a um implante de cateter na artéria femoral para posterior o registro das curvas de pressão arterial (PA) e submetidos ao exame de ecoDopplercardiograma (foram obtidos dados de diâmetros das cavidades cardíacas, da função sistólica e diastólica do VE). No sexto dia após IAM, com os animais acordados, registrou-se por 30 min as curvas de PA para o cálculo da PA Sistólica e PA Diastólica, da frequência cardíaca (FC), e também para a análise da variabilidade da FC no domínio do tempo (VARPI e RMSSD) e da frequência (análise espectral dos componentes de alta e baixa frequência e sua relação (AF, BF, AF/BF, respectivamente). No sexto dia, os animais foram novamente anestesiados para realizarem o exame de tomografia por emissão de pósitrons (PetScan) para avaliar a captação do análogo da glicose 18F-2-fluoro-2 desoxiglicose (*Standardized Uptake Value*, SUV) no cérebro e no coração. No sétimo dia os animais foram eutanasiados e foi feita coleta do coração para posterior quantificação da expressão gênica (mRNA) de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, e MCP-1) do VE.

ESTATÍSTICA: A análise dos resultados foi realizada com o programa GraphPad Prism®. A normalidade dos dados foi testada com o teste de Kolmogorov-Smirnov (KS). O teste ANOVA de uma via foi usado para análise entre os grupos. Para a análise *post-hoc*, foi usado o teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes se $p < 0,05$. Os dados paramétricos foram apresentados em média e desvio padrão. **RESULTADOS:** Os grupos infartados (IAM e IAM+PI) apresentaram valores de semelhantes PAS, PAD e PAM e significativamente menores comparados ao grupo Sham ($p=0,001$). A FC não apresentou diferenças entre os três grupos. O grupo IAM quando comparado ao grupo Sham, apresentou na análise da variabilidade da FC aumento significativo da modulação simpática (BF% $p=0,035$ e BF/AF $p=0,001$) e redução da parassimpática (AF% $p=0,012$), e na variabilidade da PA, houve significativa redução da VARPAS (0,007). O grupo de animais tratados (IAM+PI) quando comparados ao grupo infartado sem tratamento (IAM) apresentou

significativo aumento na modulação parassimpática (RMSSD $p=0,005$, VARPI $p=0,001$) e melhora na sensibilidade do baroreflexo (Índice alfa $p=0,026$); ainda, o grupo IAM+PI teve maior modulação parassimpática quando comparado ao grupo Sham (RMSSD $p=0,008$, VARPI $p=0,008$) e maior sensibilidade do baroreflexo (Índice alfa $p=0,007$). O grupo infartado (IAM), quando comparados ao grupo Sham, apresentou alterações morfo-funcionais esperadas: valores significativamente maiores ($p \leq 0,001$) dos diâmetros volumes e áreas do VE, tanto na sístole quanto na diástole, e na razão E/A; e valores significativamente menores na Fração de Ejeção do VE ($p \leq 0,001$) e na Variação Fracional da Área (VEFAC) ($p = 0,015$). No grupo infartado tratado (IAM+PI), quando comparado com o grupo IAM, todos os diâmetros volumes e áreas do VE, tanto na sístole quanto na diástole, e a razão E/A foram significativamente menores ($p \leq 0,01$), e a VEFAC foi significativamente maior ($p \leq 0,04$), indicando efeito benéfico da PI na estrutura e nas funções sistólica e diastólica do VE. Por meio da técnica de PetScan do coração, não foi possível evidenciar diferenças entre os grupos na captação de glicose (metabolismo), em nenhum dos segmentos ventriculares analisados. Porém com o PetScan cerebral foi possível evidenciar diferenças significativas entre os grupos. O grupo infartado (IAM), comparado com o grupo Sham, apresentou valor significativamente menor captação de glicose (SUVs) pelo tecido cérebro total, e em 8 regiões cerebrais estudadas: núcleo accumbens D e E, Hipotálamo D e E, Bulbo, Amígdala E, Córtex entorrinal E, e Córtex olfatório E. O grupo infartado tratado (IAM+PI) apresentou valores de captação de glicose não estatisticamente diferentes do grupo infartado sem tratamento (IAM). Porém, quando comparado ao grupo Sham, o grupo IAM+PI apresentou menor captação de glicose no tecido cerebral total e em 4 regiões cerebrais. Ou seja, o grupo que usou PI deixou de ser diferente do grupo Sham em 4 regiões: núcleo accumbens D, amígdala E, Córtex entorrinal E, e Córtex olfatório E, sugerindo um efeito modulador da medicação sobre o metabolismo dessas regiões cerebrais, que estão relacionadas ao comportamento do animal. Com relação a expressão gênica, evidenciamos aumento significativo ($p \leq 0,01$) do mRNA das citocinas TNF- α , IL-6, IL-17A IL-10 no grupo IAM+PI comparado ao grupo Sham e ao grupo IAM sem tratamento. A expressão de mRNA de MCP-1, IL-1 β , e IL-13 não apresentou diferenças entre os grupos. **CONCLUSÃO:** O IAM provoca já na fase inicial (sete dias após a injúria isquêmica) não somente respostas locais, como aumento da expressão de citocinas e alterações morfo-funcionais do VE, mas se associa a à redução na PA e do metabolismo do tecido cerebral, em especial em áreas de controle autonômico e comportamental. O tratamento com PI, nesse período, aumenta a modulação vagal e, apesar de aumentar de forma significativa a expressão gênica de citocinas pró- e anti- inflamatórias do VE, melhora parâmetros de remodelamento cardíaco. Apesar de não afetar a PA, o tratamento com PI mantém o metabolismo de áreas do SNC relacionadas ao comportamento, indicando que o efeito nessas áreas independe de modulação do fluxo sanguíneo central.

Palavras-Chave: Infarto Agudo do Miocárdio, SHR, Piridostigmina, 18F-FDG, Expressão gênica de citocinas.

ABSTRACT

Cholinergic stimulation effects on morphofunctional aspects of the heart and on cerebral metabolism after myocardial infarction in Spontaneously Hypertensive Rats.

INTRODUCTION: Acute myocardial infarction induces local or systemic changes that generate shifts in hemodynamic, autonomic, metabolic, neuro-humoral and inflammatory responses leading to homeostatic and allostatic disruptions. Along the condition, the reflex action of both peripheral and central nervous system is playing its role. The recognition of a neuro-immune system interaction gained strength with the cholinergic anti-inflammatory pathway moreover, that this circuit can be modulated in different ways, including pharmacological agents promoting parasympathetic stimulation in order to decrease reflex inflammatory responses. **OBJECTIVE:** To evaluate the actions of Pyridostigmine bromide upon the cardiovascular control of different systems, peripheral and central nervous systems involved, making use of hemodynamic, autonomic, myocardial cytokines gene expression and 18F-FDG heart and brain pet-scan in the infarcted Spontaneously Hypertensive Rat. **MATERIALS AND METHODS:** experimental study using SHR rats divided in 3 groups: Sham operated (n=14) (Sham), infarcted (n=19) (I) and infarcted treated with pyridostigmine (I+PY) right after infarction and for 7 days (n=19). Along the experiment, different analysis were performed: hemodynamic variables such as SBP, DBP, MAP and HR and autonomic parameters such as HRV in the time-domain (RMSSD and SDNN) and frequency-domain (LF%, HF%, LF(nu), HF(nu) LF/HF ratio) were performed; Echocardiographic evaluation and arterial catheterization for cardiac morphometric and functional variables including LV area and volume, LV mass, LV systolic and diastolic functions. Besides, heart and brain 18F-FDG pet-scan images in order to measure glucose uptake (Standardized Uptake Value, SUV) metabolism. And myocardial LV tissue extraction for mRNA cytokines gene expression quantification. **STATISTICS:** All statistical analysis were performed with GraphPad Prism®. All data were represented as means \pm the standard error of the mean (SEM), the one-way analysis of variance ANOVA was performed for differences among the groups. The normality of the data was tested with the Kolmogorov-Smirnov (KS) test. *P* values less than 0,05 were considered significant. Bonferroni test was used in the post-hoc analysis. **RESULTS:** A significant decrease was found in systolic, diastolic and mean arterial pressures in both infarcted groups (I and I+PY) as compared to Sham (I vs Sham, $p=0,001$); (I+PY vs Sham, $p=0,001$) showing the hypotensive effect of infarction not corrected by pyridostigmine. HR values between-groups were not altered. HRV in the time domain showed an increase in RMSSD in group I+PY vs I and I+PY vs Sham (RMSSD: I+PY vs Sham $p=0,008$ and I+PY vs I $p=0,005$; HRV showed a notable enhancement presenting higher values in group I+PY than in the Sham group, indicating a powerful effect of the drug. HRV in the frequency domain showed an increase in LF% (sympathetic) and a decrease in HF% (parasympathetic) in group I vs Sham, representing the sympathetic predominance over parasympathetic activity in infarction. LF(nu) value remained augmented while HF(nu) increased in group I+PY vs I ($p=0,003$ and $p=0,001$, respectively) and in group I+PY vs Sham ($p=0,002$ and $p=0,001$, respectively) improving vagal activity in the treated rat. LF/HF sympathovagal balance showed a statistically significant difference between groups I vs Sham but this difference was not perceived in the treated group against I and Sham groups. Both SPVAR and SP exhibited decreased values in group I vs Sham and in group I+PY vs Sham. This indicates that the dropping effect in SPVAR caused by the infarction did not attenuate with pyridostigmine use. The alpha-index value was

augmented in the treated group vs Sham group (I+PY vs Sham $p=0,026$) and in the treated group vs infarcted group (I+PY vs I $p=0,007$), augmenting the baroreceptor sensibility. The cardiac effects of myocardial infarction were evaluated using echocardiography. Morpho-functional implications were observed on the following measures: diameters, volumes and areas of the LV were increased (systolic and diastolic); I vs Sham: LVS diam: $p=0,001$; LVD diam: $p=0,004$; LVS vol: $p=0,001$; LVD vol: $p=0,003$; LVS area: $p=0,001$; LVD area: $p=0,021$. When compared to the infarcted rats (I), the treated ones (I+PY) presented a decrease in diameter, volume and area values of the LV (systolic and diastolic); I+PY vs I: LVS diam: $p=0,013$; LVD diam: $p=0,001$; LVS vol: $p=0,01$; LVD vol: $p=0,001$; LVS area: $p=0,018$; LVD area: $p=0,003$; such values may indicate the benefits of pyridostigmine upon ventricular remodeling. Concerning the systolic volume (SV) pyridostigmine showed no significant compensating effect, for I+PY vs Sham ($p=0,006$) and I+PY vs IAM ($p=0,048$). The CO followed the decrease in the SV in the infarcted rats (I vs Sham $p=0,012$) and no compensation was noted with treatment. The infarcted groups showed a reduced LV ejection fraction (LVEF) (I vs Sham $p=0,002$; I+PY vs Sham $p=0,03$). On the other hand, the altered LV FAC in the infarcted group (I vs Sham $p=0,001$) exhibited attenuation in the treated group (I+PY vs I $p=0,04$) ameliorating the systolic function. The I group (I vs Sham) showed an increased E/A ratio while the treated rats had a decreased E/A ratio when compared to the infarction group (I+PY vs I $p=0,017$), indicating a positive effect of pyridostigmine in the diastolic function. No intergroup significant results were found in the uptake values of myocardial 18F-FDG PET-scan. Intergroup results were depicted in the brain 18F-FDG PET-scan, all differences between the infarcted groups against the Sham group (I vs Sham and I+PY vs Sham). Brain pet-scan values were different between the infarcted groups (I and I+PY vs Sham) in limbic system regions or limbic associated regions. The differences were observed in 13 of the 17 SUVs represented. 9 of the 13 SUVs are in the infarcted group: global, left and right nucleus accumbens, left and right hypothalamus, medulla, left amygdala, left entorhinal cortex and left olfactory ; 5 of the 13 SUVs are in the infarct treated group: global, left accumbens, left and right hypothalamus and medulla. IL-6, IL-10, IL-17A and TNF- α values were elevated in the infarcted treated group only (I+PY vs I and I+PY vs Sham) indicating a dual (?) effect of cardiac injury and/or pyridostigmine on the gene expression. IL-1 β and IL-13 showed no differences. MCP-1, a migration and infiltration monocyte/macrophage regulatory chemokine showed no differences as well. **CONCLUSION:** pyridostigmine showed a modulatory effect on hemodynamic, autonomic and echocardiographic parameters, no effect on glucose myocardial glucose uptake, but an effect on glucose brain metabolism. An asymmetrical uptake in left amygdala, left entorhinal cortex and left olfactory was noted in the infarcted group as compared to the treated group. Some brain regions (4) in non-treated infarcted rats showing less glucose uptake did not show the same in rats using pyridostigmine. Finally, a significant enhancement of the left myocardial ventricle gene expression cytokines was observed in rats treated with pyridostigmine.

Keywords: Acute Myocardial Infarction, SHR, Pyridostigmine, 18F-FDG, Cytokine Gene Expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Inibição central do Reflexo Cardiopulmonar.

Figura 2 - Componentes do reflexo inflamatório mediado pelo vago na inflamação e imunidade.

Figura 3 – O homúnculo imunológico/organização somatotópica do SNC. Circuitaria reflexa mediada pelo vago na inflamação e imunidade

Figura 4 – Vias de reconhecimento de diferentes classes de estímulos nocivos causando ativação de vias aferentes do sistema nervoso periférico.

Figura 5 – Diagrama esquemático da cascata da sinalização imunocerebral indutora do comportamento alterado na doença

Figura 6 - [18F] FDG PET. Mapa polar do ventrículo esquerdo de um camundongo

Figura 7 – Exemplo de um circuito na doença cardiovascular.

Figura 8 – Indução do infarto agudo do miocárdio por ligadura da artéria coronária.

Figura 9 – (A) Captação corporal do traçador, “body uptake”; (B) Mapas segmentares cardíacos usados para definição das áreas afetadas pelo infarto; (C) Montagem das imagens usando o template da ressonância magnética.

Figura 10 – (A) Divisão miocárdica segmentar e (B) territórios arteriais correspondentes.

Figura 11 – Comparação das médias de Pressão Arterial Sistólica entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 12 – Comparação das médias de Pressão Arterial Diastólica entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 13 – Comparação das médias de Pressão Arterial Média entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 14 – Comparação das médias da raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes (RMSSD) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 15 – Comparação das médias da variabilidade do intervalo de pulso (VARPI) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 16 – Comparação das médias do percentual do componente de baixa frequência (BF) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 17 - Comparação das médias do percentual do componente de alta frequência (AF) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 18 – Comparação das médias dos valores normalizados do componente de baixa frequência (BF) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 19 – Comparação das médias dos valores normalizados do componente de alta frequência (AF) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 20 – Comparação das médias do balanço autonômico (razão BF/AF) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 21 – Comparação das médias da variabilidade de pressão arterial sistólica (VARPAS) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 22 – Comparação das médias de pressão arterial sistólica (PAS) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 23 – Comparação das médias de índice ALFA entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 24 – Comparação das médias do diâmetro ventricular esquerdo sistólico (Diâm. VES) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 25 – Comparação das médias do diâmetro ventricular esquerdo diastólico (Diâm. VED) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 26 – Comparação das médias do Volume Sistólico Ventricular Esquerdo (Vol. SVE) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 27 – Comparação das médias do volume diastólico ventricular esquerdo (Vol. DVE) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 28 – Comparação das médias da área sistólica ventricular esquerda (Área SVE) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 29 – Comparação das médias da área diastólica ventricular esquerda (Área DVE) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 30 – Comparação das médias do volume sistólico (VS) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 31 – Comparação das médias de débito cardíaco (DC) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 32 – Comparação das médias de fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 33 – Comparação das médias da variação fracional da área (FAC) do ventrículo esquerdo entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 34 – Comparação das médias da razão E/A Fluxo Transmitral entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 35 – Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco 18F-FDG do tecido cerebral total entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 36 – Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco 18F-FDG do núcleo accumbens esquerdo entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 37 – Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco 18F-FDG do núcleo accumbens direito entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 38 – Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco 18F-FDG da média do núcleo accumbens direito e esquerdo entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 39 – Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco 18F-FDG do hipotálamo esquerdo entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 40 – Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco 18F-FDG do hipotálamo direito entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 41 – Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco 18F-FDG da média do hipotálamo direito e esquerdo entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 42 – Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco 18F-FDG do bulbo entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 43 - Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco 18F-FDG da amígdala esquerda entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 44. Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco 18F-FDG do córtex entorrinal esquerdo entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 45. Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco 18F-FDG da média do córtex entorrinal direito e esquerdo entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI. #p= 0,047 vs Sham.

Figura 46. Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco 18F-FDG do olfatório esquerdo entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 47. Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco 18F-FDG da média do Cortex Olfatório Direito e Esquerdo entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 48. Comparação das médias de expressão gênica miocárdica de interleucina 6 entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 49. Comparação das médias de expressão gênica miocárdica de interleucina 10 entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 50. Comparação das médias de expressão gênica miocárdica de interleucina 17A entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Figura 51. Comparação das médias de expressão gênica miocárdica de TNF- α entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos *primers* utilizados na expressão gênica de citocinas do ventrículo esquerdo.

Tabela 2 – Comparação das médias dos parâmetros hemodinâmicos entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI

Tabela 3 – Comparação das médias dos parâmetros autonômicos (variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e variabilidade da pressão arterial (VPAS)) no domínio do tempo e no domínio da frequência entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Tabela 4 – Comparação das médias dos parâmetros ecocardiográficos avaliados entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI

Tabela 5 – Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco 18F-FDG avaliados no PET scan cardíaco entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Tabela 6 – Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco 18F-FDG avaliados no PET scan de regiões cerebrais entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

Tabela 7 – Comparação das médias de expressão gênica miocárdica de citocinas entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

LISTA DE ABREVIATURAS

^{18}F – FDG – 18F-2 fluoro-2deoxiglicose
 α -7nAChR – receptor nicotínico alfa sete
AF – banda de alta frequência
ANV – acoplamento neurovascular
ACE – Acetilcolinesterase
ATP – Trifosfato de adenosina
BF – banda de baixa frequência
BHE – Barreira hematoencefálica
CCR2 – *CC chemokine receptor*
CC – choque cardiogênico
CGRP – *calcitonin gene-related peptide*
 CO_2 -Dióxido de carbono
ChAT – *Choline acetyltransferase*
ChATir – *Choline acetyltransferase immunoreactivity*
DMV – *Dorsal motor vagus*
DBH – *Dopamine β – hydroxylase*
CX3CL -1 – gene CX3CL = fractalkina
E/A – razão onda E/onda A
EF – *ejection fraction*
FAC – *fractional area change*
FC – frequência cardíaca
FE – fração de ejeção
GLUT – *glucose transporter*
HDL – *high density cholesterol*
HF – *high frequency*
IAM – infarto agudo do miocárdio
IAM+PI – infarto agudo do miocárdio tratado com piridostigmina
IC – insuficiência cardíaca
ICC – insuficiência cardíaca congestiva
IL-1 β – interleucina 1 beta
IL- 6 – interleucina seis
IL-10 – interleucina dez
IL-13 – interleucina treze
IL -17 A – interleucina dezessete A
IP – intervalo de pulso
IVRT – *isovolumetric relaxation time*
LAD – *left anterior descending* (artéria coronária descendente anterior)
LCX – *circumflex artery*
LDL – *low density cholesterol*
LF – *low frequency*
LF/HF – razão low frequency/high frequency (balanço autonômico)
LVDD – *left ventricular end-diameter during diastole*
M1 – macrófago M1
M2 – macrófago M2
mmHg – milímetros de mercúrio
MPI – *myocardial performance index*
mRNA – RNA mensageiro
NA – Núcleo Ambíguo

NO – Óxido nítrico
 NTS – Núcleo do Trato Solitário
 OR – *odds ratio*
 P2X1 – purinoreceptor 1 de P2X
 P2X2 – purinoreceptor 2 de P2XX
 P2X3 – purinoreceptor 3 de P2X
 PA – pressão arterial
 PaCO₂ – pressão parcial de dióxido de carbono
 PAD – pressão arterial diastólica
 PAM – pressão arterial média
 PaO₂ – pressão parcial de oxigênio
 PAS – pressão arterial sistólica
 PCR – *polymerase chain reaction*
 PET – *positron emission tomography* (tomografia por emissão de pósitrons)
 PET-RNM – *positron emission tomography*-ressonância nuclear magnética
 PVN – *paraventricular nucleus* (núcleo paraventricular)
 RCA – *right coronary artery*
 RMSSD – raiz quadrada da média das diferenças sucessivas ao quadrado, entre NN adjacentes
 RR – *interval time-series* , intervalo RR na VFC
 RVLM – *rostr ventral lateral medulla* (bulbo rostr ventral lateral)
 RWT – *relative wall thickness*
 SHR – *spontaneously hypertensive rats*
 SM – síndrome metabólica
 SNA – sistema nervoso autônomo
 SNC – sistema nervoso central
 SNE – sistema nervoso entérico
 SUV – *standard uptake volume* (volume de captação padronizado)
 TNF- α – *tumor necrosis factor alpha* (fator de necrose tumoral alfa)
 TRIV – tempo de relaxamento isovolumétrico
 UI – unidade internacional
 VARPAS – variabilidade da pressão arterial sistólica
 VE – ventrículo esquerdo
 VEC – velocidade de encurtamento circunferencial
 VFC – variabilidade da frequência cardíaca
 VLF – *very low frequency*
 VOI – *volume of interesting*
 VPA – variabilidade da pressão arterial

ÍNDICE

1. Introdução	
1.1 Disrupção homeostática: o infarto agudo do miocárdio.....	16
1.2 Ratos SHR – Características fisiopatológicas.....	24
1.3 Neuroimunomodulação (Via Colinérgica Anti-Inflamatória).....	26
1.4 PET (Positron Emission Tomography) miocárdico e cerebral no IAM.....	32
1.5 Piridostigmina como agente farmacológico na neuroimunomodulação....	36
1.6 Justificativa do trabalho.....	37
2. Objetivos.....	39
2.1 Objetivo geral	39
2.2 Objetivos específicos.....	39
3. Material e Métodos.....	40
3.1 Animais.....	40
3.2 Modelo experimental de infarto agudo do miocárdio.....	40
3.3 Canulação.....	42
3.4 Medidas hemodinâmicas.....	43
3.5 Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC).....	44
3.6 Ecodopplercardiografia.....	45
3.7 Protocolo para avaliação da expressão gênica de mRNA de citocinas no coração.....	47
3.8 Protocolo para realização de imagem PET ¹⁸ F-FDG do cérebro e do coração.....	49
3.9 Eutanásia e coleta de tecidos.....	52
4.0 Análise estatística.....	54
4. Resultados.....	55
5. Discussão	86
6. Conclusão	96
7. Referências Bibliográficas.....	97

Epígrafe

“Mas a guerra pela qual ansiavam era como uma montanha ao final da pradaria: perfeitamente visível, mas tão distante como uma miragem. Então eles se contentavam em abrir campos, pastorear animais e derrubar árvores”.

Em: O Problema dos Três Corpos, de Cixin Liu

1. INTRODUÇÃO

1.1 DISRUPÇÃO HOMEOSTÁTICA: O INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO (IAM)

No cenário das doenças cardiovasculares, o IAM ocupa um lugar de elevado destaque pelos números: dados da *American Heart Association* de 2019 revelam uma incidência anual estimada de 605 mil novos casos e 200 mil casos de recorrência, além de um alto índice de mortalidade dentro de 5 anos depois de um primeiro infarto em indivíduos com idade \geq a 45 anos: 36% para homens e 47% para mulheres com idade (1). Uma estratégia comum na prevenção de doenças cardíacas é a manutenção de uma pressão arterial saudável (1).

ALTERAÇÕES LOCAIS E SITÊMICAS PROVOCADAS PELO IAM

Tão importantes quanto os dados epidemiológicos, são as alterações provocadas pelo IAM: alterações do tipo local (miocárdio infartado e inflamado) e respostas sistêmicas (órgãos afetados pelo infarto) (2), de caráter diversificado. Estas alterações geram inflamação (3,4,5,6,7), problemas hemodinâmicos (8,9), desregulação neuro-humoral (10,11,12,13) e desequilíbrio no balanço autonômico (14,15,16,17,18,19).

A condição de miocárdio infartado compromete a interação recíproca dos sistemas regulatórios hemodinâmicos, neuro-humorais, autonômicos e inflamatórios, levando a um desequilíbrio homeostático (de homeostase) e alostático (de alostase).

Resposta cardíaca inflamatória pós-IAM

Para que ocorra um reparo inflamatório ótimo após o IAM, faz-se necessário um recrutamento celular que remova restos celulares e ao mesmo tempo cicatrize a lesão infartada, restabelecendo a função cardíaca (20). No cenário inflamatório, no entanto, a atividade leucocitária após o IAM é protetora e danosa (21).

O processo biológico subjacente à resposta inflamatória do miocárdio infartado consiste em sinalizações moleculares e celulares que atraem neutrófilos e monócitos que expressam receptores de quimiocinas CCR2 (*CC chemokine receptor 2*) ao local lesionado. Depois (poucos dias) o recrutamento muda para um recrutamento monocitário *não inflamatório* mediado por outra quimiocina, a CX3CL-1 (22). Como resultado, temos inicialmente uma subpopulação de monócitos que expressam mediadores proinflamatórios (M1) e subsequentemente uma subpopulação de monócitos e de macrófagos M2 promovendo neoangiogênese e síntese da matriz extracelular (23).

Atualmente, considera-se que a resposta monocitária pró-inflamatória está associada à lesão miocárdica, e que o aumento no número de monócitos no sangue periférico está ligado ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca depois do IAM e a um comprometimento do processo de remodelação miocárdica (24,25,26). Portanto, o processo de cicatrização que se desenvolve depois da lesão miocárdica depende dos tipos de células envolvidas e segue uma dinâmica temporal (27,28,29): imediatamente depois da lesão, há um aumento de neutrófilos atingindo um pico máximo em 3 dias, enquanto os macrófagos são os tipos celulares em maior número na área lesionada com aumento progressivo na primeira semana. Os macrófagos são tipos celulares heterogêneos que respondem de maneira diferente à lesão – aqueles

que atuam logo no início (M1, predominando com 1 a 3 dias de infarto), mostram níveis altos na expressão de mediadores proinflamatórios; os tardios (M2, predominando depois de 5 dias de infarto), expressam níveis altos de IL-10, uma interleucina anti-inflamatória. Células T CD8(+), Células B, $\gamma\delta$ T, *natural killer*, NKT e Células dendríticas mieloides atingem um pico no sétimo dia de infarto. Com mais de 1 semana de resposta inflamatória, níveis altos de citocinas como a IL-1 (30,31,32), TNF- α e IL-6 associam-se ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca (33,34). É um padrão têmporo-celular de remodelamento estrutural e funcional miocárdico que pode ser dividido em 3 grandes fases: a) fase inflamatória, de 1 a 3 dias; b) fase de granulação, de 1 a 7 dias; e c) fase de cicatrização, em semanas (35,36). Um outro aspecto – e fundamental, no processo inflamatório agudo e crônico, é o papel das citocinas, moléculas-chave que atuam em redes de interações. As citocinas podem ser classificadas e agrupadas em famílias, tendo por base a natureza da resposta imune: imunidade adaptativa (por exemplo, receptores compartilhados), sinalização pró-inflamatória (por exemplo, IL-1, IL-6, IL-17, TNF- α) e sinalização anti-inflamatória (por exemplo, IL-12, IL-10). As ações das citocinas são definidas pela sua função primária e pelos seus alvos celulares (37). Uma variedade de citocinas tem implicação na cicatrização e no remodelamento cardíaco no infarto (38), com diferentes citocinas sendo avaliadas a depender dos estudos. No nosso caso, destacamos o TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-13 e IL-17A. Em trabalhos anteriores do nosso grupo, com ratos Wistar normotensos infartados e tratados com piridostigmina, foi observada uma redução significativa nas citocinas pró inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10) no tecido miocárdico (VE) no sétimo dia após IM, redução esta associada a uma melhora da função ventricular esquerda (27).

A resposta inflamatória pós-IAM não se restringe apenas ao coração mas, como indicam estudos contemporâneos, é um processo sistêmico (39). É o que foi evidenciado, por exemplo, em estudos de imagem clínica multimodal, como o fato de que o aumento da utilização de glicose no território infartado ter sido proporcional à atividade em áreas remotas como baço e medula óssea, que se mostraram consistentes com uma ativação imune sistêmica pós-IAM (40). Isto levanta o interesse em avaliar redes inflamatórias sistêmicas dinâmicas na isquemia cardíaca, o que poderia fornecer informações acerca da resposta global à lesão por outros órgãos (41).

Outros trabalhos mostram a ocorrência de respostas neuronais associadas a uma ativação da microglia e a um aumento na sinalização neuroinflamatória, promovendo tráfego de monócitos no cérebro sob estresse (42). A microglia, parte que integra os componentes do sistema nervoso central, são células imunológicas inatas residentes no cérebro e participam em processos homeostáticos como, por exemplo, remoção de neurônios apoptóticos, decaimento de sinapses, fagocitose proteica e regulação nas quantidades de neurotransmissores (42,43). A ativação da microglia tem papel na vigilância imunológica similar à dos macrófagos periféricos (44), gerando produção de prostaglandinas, citocinas e quimiocinas (42). Esta comunicação imunocerebral assenta-se na noção da unidade neurovascular (e o acoplamento neurovascular), comentada mais adiante. Nesse sentido, a unidade neurovascular é promotora das interações microdinâmicas entre a vasculatura sistêmica e as células parenquimatosas locais como neurônios e microglia, permitindo o tráfego de monócitos e macrófagos que influenciam o comportamento (42,45). Esse papel do eixo imunocerebral foi descoberto através de estudos experimentais que impediam o tráfego monocitário até o cérebro(46,47).

De grande importância para o nosso trabalho, é a presença de citocinas próinflamatórias no cérebro depois do IAM, ainda mais porque tais achados mostraram-se *independentes* das citocinas plasmáticas. Isto sugere que aferências cardíacas simpáticas ativadas pelo infarto sinalizariam para o SNC, tendo como resposta um aumento de citocinas pelo cérebro; além disso, há o achado da necessidade da integridade do nervo vago para que essa produção de citocinas próinflamatórias aumente, o que leva à conclusão de que tanto a inervação cardíaca simpática quanto a inervação cardíaca parassimpática estão envolvidas na resposta inflamatória ao IAM. O infarto causa não só um aumento significativo de TNF- α e de IL-1 β no coração e no plasma, mas também um aumento significativo de TNF- α e de IL-1 β no hipotálamo (48).

Alterações do fluxo sanguíneo cerebral pós- IAM

O cérebro adulto humano pesa cerca de 1500g (2% do peso do corpo) e necessita de um aporte constante, ininterrupto, de cerca de 150g de glicose e 72 litros de oxigênio a cada 24 horas. Isto equivale a 20% do total de consumo de oxigênio de todo o corpo. Pelo fato de o cérebro não estocar essas substâncias, qualquer redução a níveis críticos de glicose e/ou oxigênio provoca disfunção central, tornando o SNC dependente da circulação sistêmica. Cada contração cardíaca fornece cerca de 70 ml de sangue à aorta ascendente, dos quais 10 a 15 ml chegam ao cérebro. Por minuto, cerca de 350 ml de sangue fluem através das artérias carótidas internas e cerca de 100 a 200 ml fluem pelo sistema vertebrobasilar, o que permite um fluxo sanguíneo cerebral de 50 mL/min por 100 g. Abaixo desse valor, começam disfunções cerebrais de natureza vascular. O que garante uma pressão de perfusão cerebral e

fluxo sanguíneo constantes para o cérebro, diante da variabilidade da pressão arterial sistêmica, é um processo fisiológico denominando autorregulação cerebral. Isto deve-se ao fato de que as arteríolas cerebrais possuem uma camada muscular bem desenvolvida, capazes de responder com vasoconstrição a aumentos na pressão arterial sistêmica e vasodilatação na hipotensão. Além disso, as arteríolas cerebrais são bastante sensíveis a mudanças nas concentrações arteriais periféricas de PaCO_2 e PaO_2 . Em condições normais, a autorregulação cerebral permite um fluxo sanguíneo cerebral constante, numa faixa de variação da pressão arterial média entre 60 a 140 mmHg (49). Ainda em condições normais, como o suprimento sanguíneo não permanece constante em todas as regiões cerebrais (diferentes regiões cerebrais estão envolvidas temporal e espacialmente em diferentes tarefas), torna-se crítico que um aumento no fluxo sanguíneo cerebral ocorra de forma restrita em áreas ativadas para diferentes “tarefas”, garantindo o aporte de oxigênio e nutrientes justamente nessas áreas que foram ativadas. Esse ajuste regional fino no fluxo sanguíneo cerebral é definido como acoplamento neurovascular (ANV), e representa uma função cerebral fundamental (50). Essa unidade neurovascular tem como componentes neurônios, astrócitos e vasos sanguíneos (células endoteliais, células musculares lisas e pericitos) (51,52), e é uma entidade dinâmica que gerencia os mecanismos de acoplamento neurovascular (ANV) na liberação de neurotransmissores, neuromoduladores e mediadores vasoativos (50).

Em condições anormais (em humanos), como no choque cardiogênico resultante de insuficiência cardíaca (IC), há hipoperfusão tecidual sistêmica (53). Condições que gerem hipotensão e consequente diminuição na perfusão tecidual como o choque cardiogênico (CC), podem alterar a pressão de perfusão cerebral. Nesse caso (CC), o coração não consegue manter um fluxo sanguíneo adequado às

necessidades teciduais, causando disfunções orgânicas (54). O IAM é a causa mais comum de IC e tem uma incidência de 5 a 8% (55), e está associada a uma área de infarto maior que 40% no ventrículo (56).

Em camundongos submetidos a indução cirúrgica de infarto agudo do miocárdio, o fluxo sanguíneo cerebral mostrou-se significativamente diminuído logo após (no primeiro dia) e até 30 dias após o infarto (36). A razão para isso é que o fluxo sanguíneo cerebral (FSC), além de sua propriedade autorregulatória, também é dependente do débito cardíaco, recebendo um aporte contínuo do mesmo. O baixo débito, associado à disfunção cardíaca do coração infartado, resulta num FSC reduzido, independentemente de outros parâmetros que o regulam (como pressão arterial e CO_2) (57). É importante observar que esse estado de diminuição da perfusão deve-se a uma queda do DC e a um comprometimento da autorregulação (58) na insuficiência cardíaca, tanto aguda quanto crônica, e está associado inversamente à pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (59). Em outras palavras, a insuficiência cardíaca é indutora de disfunção cerebral (60).

Apesar de estar estabelecido que FSC e metabolismo energético cerebral regional estão associados à função cerebral (61,62), medidas do FSC são limitadas, porque a ligação exata entre as alterações observadas e seus processos neurofisiológicos subjacentes é desconhecida. Por exemplo, afirmar categoricamente que determinada estrutura cerebral desempenha determinada tarefa baseando-se apenas no aumento de fluxo. Há fortes evidências, no entanto, de que o FSC reflete necessidades metabólicas específicas de diferentes sistemas de neurotransmissores, particularmente no estudo com fármacos em condições específicas (63).

Nesse sentido, métodos que quantifiquem a atividade metabólica cerebral podem ser utilizados para inferir a perfusão de determinadas regiões cerebrais. De

forma complementar, o IAM poderia alterar a atividade de regiões cerebrais associadas ao comportamento e a um estado inflamatório sistêmico.

Disfunção ventricular pós-IAM e desequilíbrio autonômico

A disfunção ventricular resultante da necrose miocárdica leva a mecanismos compensatórios como a exacerbação simpática e a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, que visam inicialmente restaurar a homeostase cardiovascular (64,65,66). Quando o músculo cardíaco é infartado, tanto aferências simpáticas quanto parassimpáticas são estimuladas. Estas aferências, mecanorreceptores, aumentam suas descargas e o braço simpático da aferência, com o aumento da excitação, causa inibição tônica e reflexa da atividade vagal eferente (16,67,68,69). Acrescido a isso, a redução da função do ventrículo esquerdo e do débito cardíaco são estímulos mantenedores do predomínio do simpático sobre o parassimpático, no sentido de manutenção do *output* cardíaco. No entanto, em longo prazo, a atividade simpática sustentada colabora para o aumento da atividade do sistema renina angiotensina aldosterona e a uma má adaptação cardiovascular (70), caracterizada clinicamente pelo desenvolvimento de quadro de insuficiência cardíaca (IC) (64). Na verdade, a IC é um marco distintivo nas complicações do IAM, podendo ocorrer em até 2/3 dos casos de IAM que acometem grandes extensões do VE (71). Esta insuficiência cardíaca pode ser considerada resultado de uma perda de músculo cardíaco, associada à disfunção autonômica reflexa inicialmente compensatória e à hiperatividade simpática (72,73,74), causando uma disfunção do barorreflexo, um aumento da vasoconstrição periférica e uma alteração do balanço autonômico

cardíaco (75). Ao mesmo tempo, há indicações de que o mecanismo autonômico contra regulatório, o eixo parassimpático, está diminuído (69,76).

1.2 RATOS SHR - CARACTERÍSTICAS FISIOPATOLOGICAS

Ratos SHR (do inglês *Spontaneously Hypertensive Rats*) são ratos usados em modelos experimentais para medicina e biologia. É um dos modelos de animais com hipertensão de origem genética, denominada Hipertensão Neurogênica. Sua origem remonta ao ano de 1963, em Kyoto, no Japão (77). A linhagem desses ratos foi estabelecida a partir de cruzamentos entre ratos Wistar de uma mesma ninhada que apresentassem os maiores valores de pressão; que depois de 20 gerações, os ratos passaram a ter hipertensão espontânea na idade adulta. Ratos SHR são usados em testes de drogas hipertensivas, hipertensão, doenças cardiovasculares e esquizofrenia. A hipertensão nos SHRs é caracterizada por: a) aumento da resistência periférica total e débito cardíaco normal ou diminuído, ao que se segue uma hipertrofia cardíaca progressiva e finalmente insuficiência cardíaca congestiva; b) aumentos precoces da frequência cardíaca; c) fatores neurais como hiperatividade simpática (78).

Quanto a aspectos metabólicos, foi observado haver um aumento no metabolismo no ventrículo esquerdo de SHRs quando comparados a ratos WKY (Wistar Kyoto Rats), em estudos que avaliaram o metabolismo da glicose com PET de miocárdio (^{18}F -FDG) (79). Essa observação gerou a hipótese de que ocorrem alterações metabólicas associadas ao grau de hipertrofia ventricular esquerda (80). De fato, ratos SHR expressam um aumento na liberação de ATP (Trifosfato de adenosina) como cotransmissor simpático (relativamente à liberação de

noradrenalina). O aumento de ATP está associado a inibição do reflexo cardiopulmonar (CCR) sobre a atividade do nervo simpático renal, adrenal e lombar. Sugere-se que o ATP atua nesse reflexo a nível central, no Núcleo do Trato Solitário, via facilitação da liberação do neurotransmissor GABA nesse núcleo. (Figura 1) (81,82). Ainda, o ATP liberado em co-transmissão com noradrenalina nas terminações nervosas periféricas age nos receptores P2X1, causando vasoconstrição da musculatura lisa (82,83,84,85) potencializando a vasoconstrição e aumento da resistência vascular periférica.

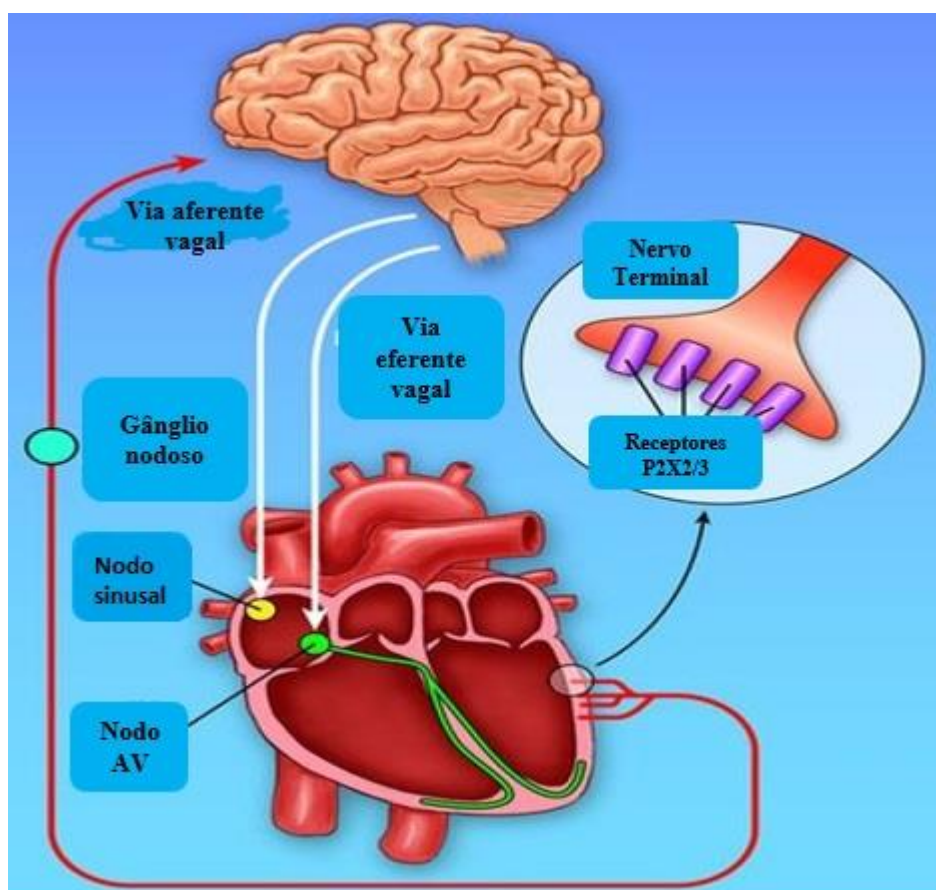


Figura 1. Inibição central do Reflexo Cardiopulmonar. A figura mostra as aferências e eferências vagais envolvidas no reflexo cardiopulmonar, mediado por aumento da atividade do ATP sobre receptores P2X2/3 no miocárdio; a via aferente é a via inibitória (em vermelho) agindo sobre o Núcleo do Trato Solitário no cérebro (bulbo). Figura adaptada das referências (81,82).

Outro aspecto importante da condição basal dos ratos SHR, foi a demonstração de que o fluxo sanguíneo cerebral é diminuído no córtex e no tálamo de SHRs

comparado a ratos normotensos, por meio da técnica do clearance de hidrogênio (86). Ainda, a utilização de glicose no cérebro de SHRs apresentou-se reduzida em 14 de 28 áreas cerebrais estudadas, quando comparadas a áreas de ratos WKY (87).

É digno de nota afirmar que esses animais (SHR) possuem um grau elevado de carga alostática. Carga alostática é o “custo” cumulativo dispendido pelo organismo para manter a alostase. O conceito de alostase refere-se aos processos reguladores mantenedores de uma estabilidade quando o indivíduo é exposto a uma mudança ambiental e emprega comportamentos e respostas fisiológicas que promovem adaptação e aumentam as chances de sobrevivência, pelo menos em curto prazo (88). Mediadores alostáticos podem ser, por exemplo, os hormônios do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal, o sistema nervoso autônomo e as citocinas pró e anti-inflamatórias(89,90). Nesse caso, o efeito adaptativo do coração diante da hipertensão promove o desempenho sistólico, ao mesmo tempo influenciando a função diastólica; de maneira que ajustes secundários fazem-se necessários para incrementar o enchimento ventricular e/ou inotropismo (91).

1.3 NEUROIMUNOMODULAÇÃO (VIA COLINÉRGICA ANTI-INFLAMATÓRIA)

Além do papel do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) no controle reflexo cardiovascular, foi descoberto recentemente, em modelos experimentais de doenças sépticas e assépticas, o importante efeito modulador do SNA sobre a resposta inflamatória.

Particularmente, foi descrito um circuito neural (92), denominado de reflexo anti-inflamatório colinérgico (93). Trabalhos conduzidos pelo grupo de Tracey KJ. e cols. propuseram o conceito de que o Sistema Nervoso Parassimpático reduz a

resposta inflamatória através das células efectoras relacionadas à imunidade inata e adquirida. O reflexo inflamatório envolve o nervo vago que, detectando o processo inflamatório periférico, transmite essa informação da periferia para o tronco encefálico (braço aferente) e áreas no SNC que integram essa informação; como resposta, há geração de potenciais de ação que trafegam por fibras vagais eferentes (braço eferente) até o baço e demais estruturas do sistema imune (linfonodos, fígado, medula óssea) (94). A estimulação do nervo vago eferente colinérgico ativa neurônios adrenérgicos no gânglio celíaco, que inervam o baço e liberam noradrenalina que atuam em receptores $\beta 2$ presentes na superfície de linfócitos T ChAT⁺ secretores de acetilcolina, que interage com a subunidade $\alpha 7$ do receptor de ACh nicotínico ($\alpha 7$ nAChR) que é expressa em macrófagos, levando a uma redução significativa na produção de citocinas pró-inflamatórias (95) e aumentando a resposta anti-inflamatória em diferentes modelos experimentais(94,96,97,98,99). Esse controle reflexo da imunidade, chamado de “via anti-inflamatória colinérgica”, tem sido motivo de grande investigação como uma estratégia terapêutica, *id est*, neuromodulação nas doenças inflamatórias e autoimunes (100,101). Deve ser lembrado que o reflexo colinérgico anti-inflamatório é a via eferente do Reflexo Inflamatório (Figura 2).

Diferentes estudos têm sido realizados, aumentando o conhecimento quanto aos elementos que compõem o circuito do reflexo inflamatório: os mediadores que iniciam a resposta reflexa são citocinas (ex.: TNF-alfa, IL-6) que passam a barreira hematoencefálica, ou estimulam as vias aferentes (vagais), que levam as informações da periferia para o SNC; núcleos/áreas específicas do SNC participam da integração central dessas informações (Figura 3); como resposta dessa integração, há alteração da atividade do sistema nervoso simpático e parassimpático e do eixo hipotálamo-hipofisário, tendo como alvo estruturas do sistema imunológico (ex. baço, linfonodos, fígado), resultando em alterações na produção de citocinas e modulação da resposta inflamatória (aumentando ou reduzindo).

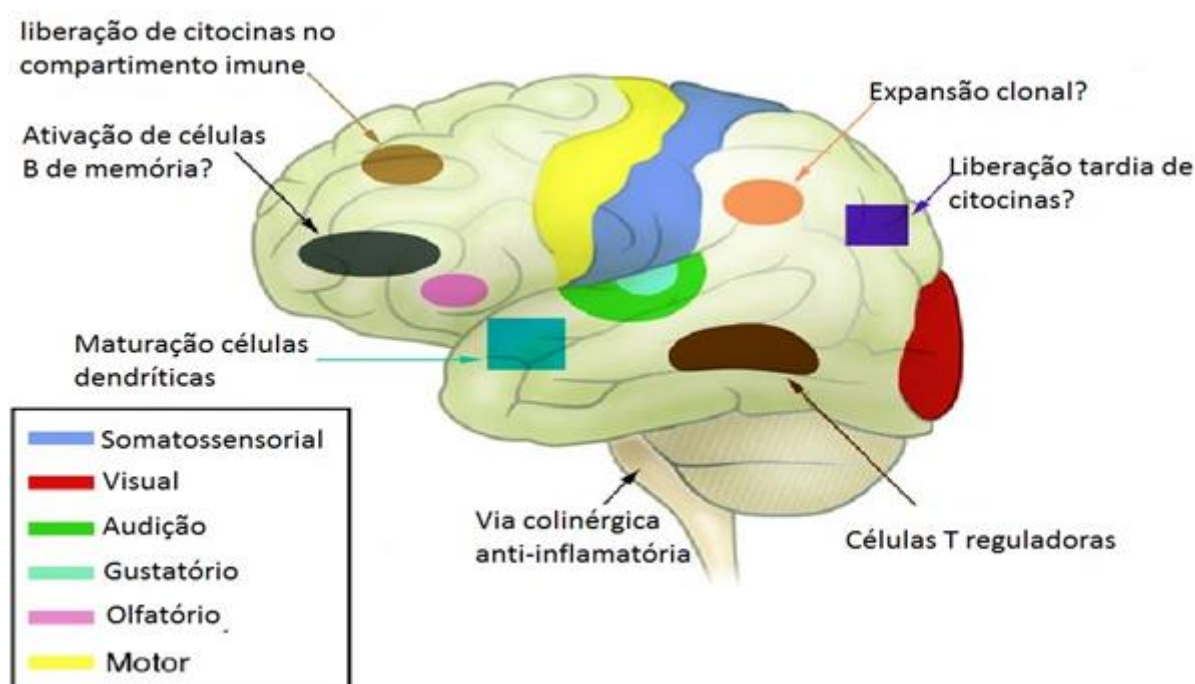


Figura 3. O homúnculo imunológico. As diferentes áreas coloridas representam a organização somatotópica do reflexo anti-inflamatório no SNC. Figura adaptada da referência (102).

Outro mecanismo de ativação desse reflexo pode ocorrer a nível periférico. No sentido clássico, fazendo parte do sistema nervoso *somático* e ainda hoje muito estudada, a inflamação neurogênica refere-se ao conceito de que nervos sensitivos, por meio de fibras nervosas tipos C e Aδ participam na inflamação e tem uma via particular de ativação, que tem início nas terminações nervosas sensitivas, chegam ao gânglio da raiz dorsal (sensitiva), trafegam via neurônios aferentes até as terminações nervosas e finalmente liberam certas classes de peptídeos tais como Substância P, CGRP (*calcitonin gene-related peptide*) e Somatostatina (103). Essa ativação local é chamada reflexo axonal, que pode ser ativado por estímulos exógenos e endógenos, como estímulos térmicos, mecânicos e químicos envolvidos na dor, ao mesmo tempo atuando sobre a regulação cardiovascular e inflamação (104), recrutando e ativando células da imunidade inata (mastócitos, células dendríticas) e adaptativa (linfócitos T) (105).

Apesar de já mostrarem uma interação entre os sistemas nervoso e imunológico, os estudos sobre o reflexo axonal tiveram foco, historicamente, na dor enquanto sintoma mais do que na dor como parte integral no processo inflamatório. Atualmente, uma plethora de estudos confirma uma interação estrita entre os dois sistemas, tendo em vista uma intensa rede de inervação de fibras sensitivas e *autonômicas* nos tecidos periféricos e a rápida resposta da transdução neural, que favorece a modulação neural imunológica local e sistêmica, respectivamente (Figura 4) (105). Temos, portanto, dois sistemas neurais periféricos que regulam a inflamação e a imunidade. O reflexo axonal, ativado por nociceptores e de ação mais restrita ao local, proinflamatório; e uma resposta autonômica de caráter sistêmico, imunossupressora, como veremos adiante, na qual fibras aferentes vagais colinérgicas viscerais sinalizam e promovem ativação neuronal no SNC (105, 106).

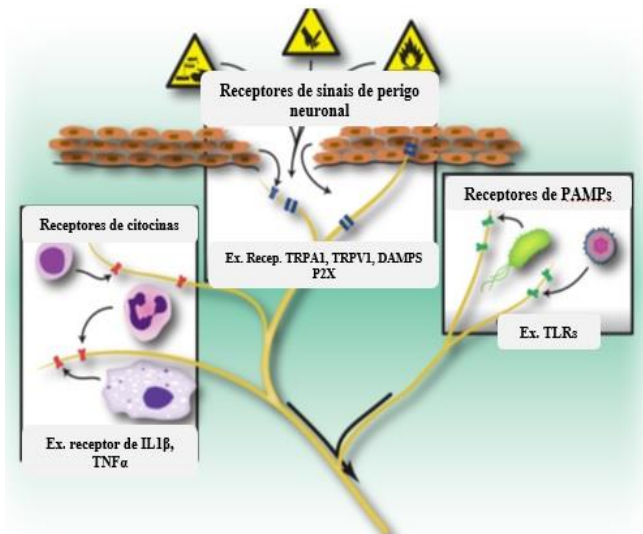


Figura 4. Vias de reconhecimento de diferentes classes de estímulos nocivos (incluindo dor e mediadores inflamatórios) causando ativação de vias aferentes do sistema nervoso periférico. Por exemplo, um estímulo térmico danoso é recebido por aferências sensitivas nervosas que transmitem a informação somática para os gânglios das raízes nervosas (não representados na figura) e ganham a via sensitiva apropriada na medula espinhal, conduzindo-a assim da periferia até o SNC. IL1 β : Interleucina 1 beta; TNF α : Fator de necrose tumoral alfa; TRPA1: Receptor de potencial transitório anquirina tipo 1; TRPV1: Receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1; P2X: Receptor purinérgico X; DAMPs: Padrões Moleculares Associados a Danos; TLRs: Receptores Toll-likes. Figura adaptada da referência (105).

Como parte da resposta inflamatória sistêmica, ocorre uma importante resposta comportamental, por atuação em áreas do hipotálamo (Figura 5) seguindo o que se denomina de cascata de sinalização imunocerebral. Essa sinalização é indutora do comportamento alterado na doença: inapetência, alterações do humor, fadiga, aumento de sensibilidade à dor (107).

É assim que funciona

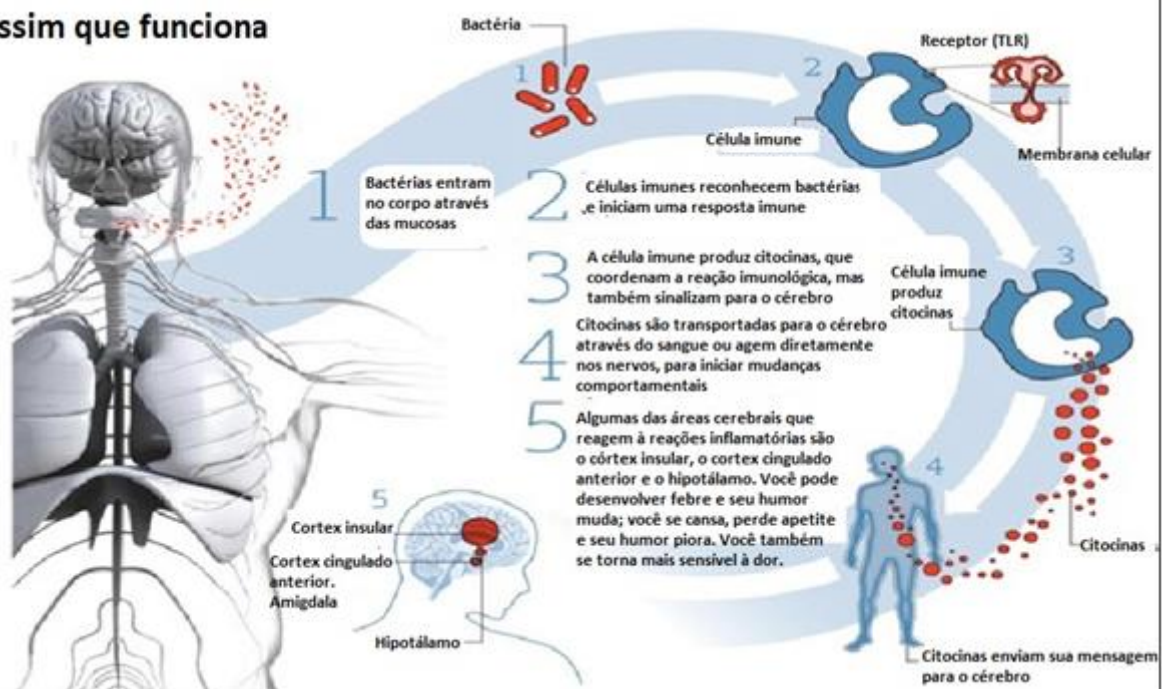


Figura 5. Diagrama esquemático da cascata da sinalização imunocerebral indutora do comportamento alterado na doença. Patógenos invadem o organismo, reconhecimento de patógenos pelo sistema imune, produção de citocinas, transporte de citocinas para o cérebro via circulação sanguínea e nervosa – nervos; finalmente, uma reação cerebral causada pela estimulação inflamatória gerando febre, inapetência, alterações do humor, fadiga, aumento de sensibilidade à dor. Figura adaptada da referência (107).

1.4 METABOLISMO CARDÍACO E CEREBRAL - TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE POSITRONS (PET - POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY)

A tomografia por emissão de pósitrons – PET (*Positron Emission Tomography*) é um método de imagem que permite visualizar (e quantificar) certos processos fisiológicos *in vivo*. Tem por base a propriedade de isótopos emitirem pósitrons que se incorporam a moléculas que fazem parte de processos fisiológicos. Carbono-11, Fluor-18 são exemplos de traçadores - radioisótopos que são fonte de pósitrons – que são incorporados a moléculas envolvidas em processos fisiológicos como a glicose, por exemplo. Ou seja, os traçadores marcados (“rotulados”) com

radionuclídeos emissores de pósitrons podem ser incorporados a substâncias químicas como glicose, água, amônia, refletindo processos biológicos específicos.

Após administração, o decaimento dos pósitrons é medido no corpo por detectores de alta sensibilidade pelo *scanner* ao redor do sujeito, e as imagens daí resultantes, visualizadas usando-se escalas de cor, exibem as concentrações radioativas no tecido estudado (108). O traçador para PET mais comumente utilizado é o 18F-2-fluoro-2-desoxiglucose, conhecido como FDG, e sua captação reflete o consumo local de glicose. O FDG é um análogo de substrato, no caso a glicose, que fica retido metabolicamente no tecido alvo, fornecendo amplificação do sinal e melhora na qualidade da imagem. A captação e retenção de FDG traduz a atividade de vários transportadores de glicose (GLUT, de *glucose transporter*) e da fosforilação mediada por hexoquinases de forma similar à glicose não marcada. O PET 18F-FDG avalia, portanto, processos metabólicos dependentes de glicose (11).

Tanto em pesquisa básica quanto na clínica o uso de PET tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, e de maneira contínua, desde 1977 (108), sendo hoje cada vez mais comum em oncologia, neurologia, psiquiatria, cardiologia e pesquisa.

Nas áreas de neurologia e psiquiatria, as aplicações do PET, alimentadas pelo desenvolvimento de novos traçadores, têm sido focadas na mensuração da função cerebral geral, no estudo da integridade da barreira hematoencefálica, na neuroinflamação, atividade enzimática, liberação e síntese de neurotransmissores, metabolismo, ou seja, em processos subjacentes servindo de estudo em doenças como Alzheimer, Parkinson, tumores cerebrais, Doença de Huntington, Esquizofrenia, Síndrome depressiva, Transtornos ansiosos e outras doenças do espectro neuropsiquiátrico. Também, no desenvolvimento de drogas que atuem no sistema

nervoso ou na função mental (mecanismos de ação de drogas, ocupação de receptores e metabolismo da droga, por exemplo) (108).

Na cardiologia, também beneficiada pelo desenvolvimento de novos traçadores, o PET tem sido aplicado em áreas como metabolismo cardíaco (Figura 6), imagem de neuro receptores cardíacos (alterações geradas por disfunção cardíaca de origem pré-sináptica e pós-sináptica, e.g. Insuficiência Cardíaca, angiogênese, remodelação miocárdica pós-infarto, viabilidade miocárdica no IAM, aterosclerose) (11). O uso do PET clínico no IAM está bem estabelecido, como apontam estudos recentes na avaliação da atividade celular imunológica/processo inflamatório que o acompanha (22,39,41,109,110,111).

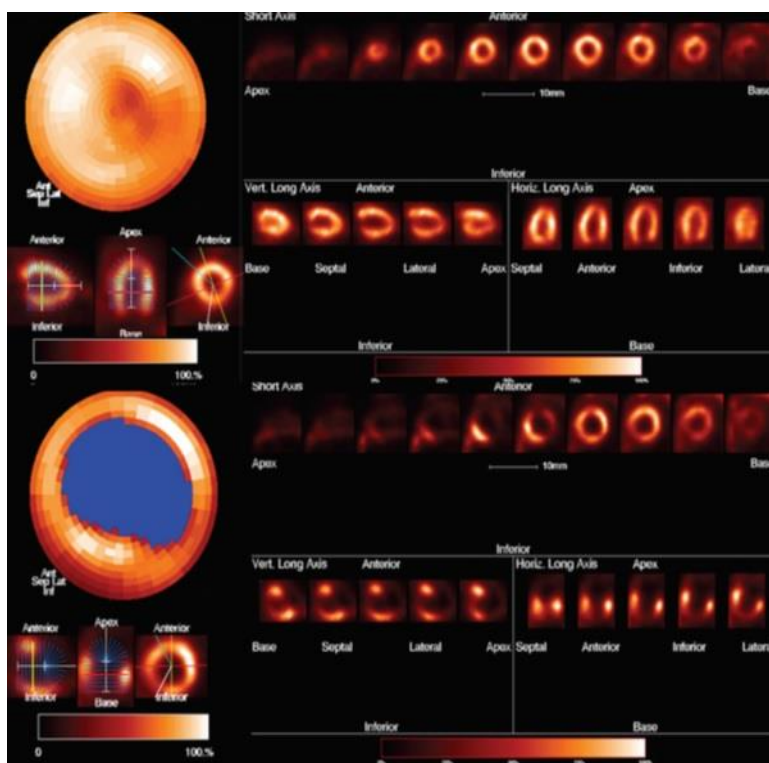


Figura 6. Captação do análogo da glicose ^{18}F -FDG no PET-scan. Mapa polar do ventrículo esquerdo de um camundongo normal (acima) e em um camundongo com infarto agudo do miocárdio (abaixo). [Software MunichHeart] (112).

Recentemente, começaram a surgir na literatura trabalhos de caráter translacional, trabalhos de imagem multiparamétrica e trabalhos de multimodalidade

de imagem, como nos exemplos a seguir. De caráter translacional: a incorporação de exames de imagem e avaliação cognitiva nas terapias de modulação da resposta inflamatória ao infarto do miocárdio (39). De imagem multiparamétrica, isto é, que testam simultaneamente múltiplos biomarcadores: caso do uso de PET/RNM e imagem óptica multicanal nas doenças cardiovasculares (113). De multimodalidade de imagem: com o uso de PET cardíaco e RNM cardíaca na caracterização do miocárdio agudamente infartado e inflamado (40).

A vantagem dos exames de imagem é a de que podem ser usadas para registrar/medir o que está acontecendo em diversos sistemas e mecanismos ao mesmo tempo, como por exemplo, a resposta de um determinado órgão ou tecido a um insulto deflagrado em outro órgão (IAM – respostas autonômicas – cérebro).

A Figura 7 mostra um exemplo de um circuito – dentre outros possíveis - na doença cardiovascular, onde vemos 4 sistemas em interface uns com ou outros. É um exemplo de como uma doença cardiovascular, afetando vasos que conectam múltiplos sistemas biológicos, permite a interação entre os órgãos por meio da circulação. Abordagens como essa (usando PET) permitem visualizar/quantificar e confirmar que a resposta inflamatória depois do IAM não é apenas local mas também sistêmica (40,114), avaliando redes dinâmicas inflamatórias sistêmicas fornecendo, portanto, informações sobre respostas globais a partir do tecido lesionado (41).

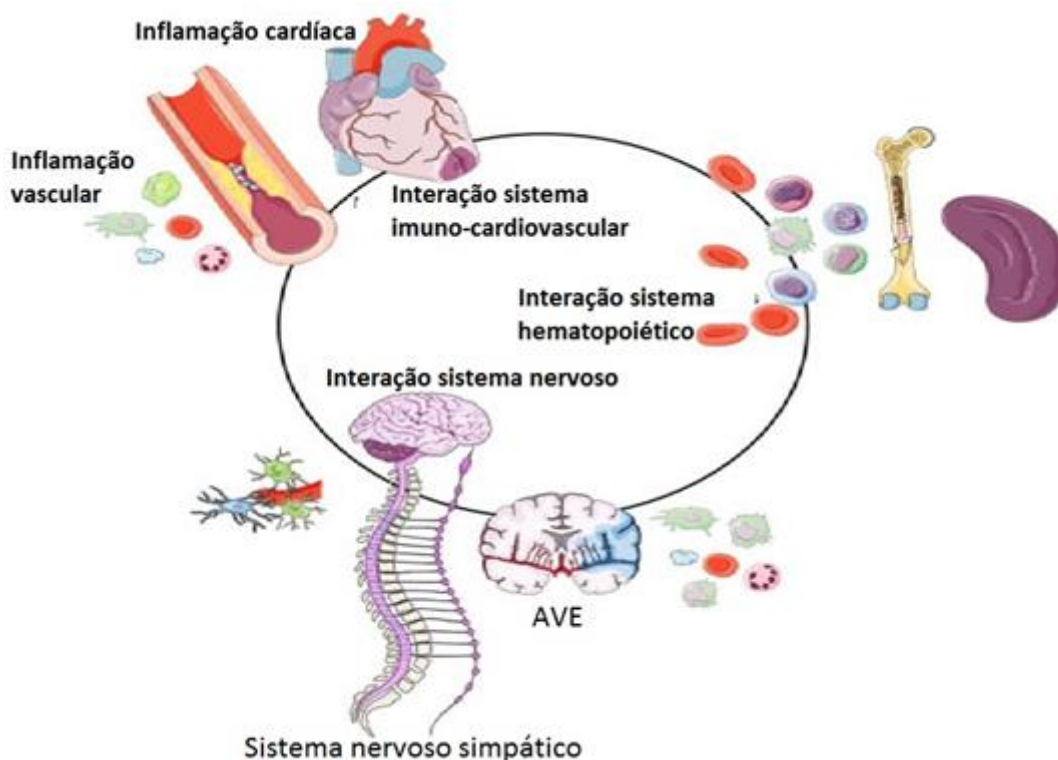


Figura 7. Exemplo de um circuito na doença cardiovascular. Interações imunocardiavasculares, hematopoieticas e do sistema nervoso, formando um circuito na doença cardiovascular. Figura adaptada da referência (113).

1.5 PIRIDOSTIGMINA COMO AGENTE FARMACOLÓGICO NA NEUROIMUNOMODULAÇÃO

A piridostigmina é um anticolinesterásico, ou seja, uma droga que inibe a acetilcolinesterase, enzima que degrada a acetilcolina. A piridostigmina, por ser uma amina quaternária, tem ação periférica e não atravessa a barreira hematoencefálica BHE. Na prática clínica, é um fármaco utilizado no tratamento da Miastenia Gravis (115), reduzindo a hidrólise da acetilcolina.

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 identificadas após infarto do miocárdio (IAM), podem ser restauradas com intervenções fisiológicas e farmacológicas que atuam na via anti-inflamatória colinérgica (27,28,84,116). De forma significativa, os efeitos da estimulação colinérgica estão relacionados com uma modulação na inflamação e melhora da função ventricular dos animais pós IAM. No IAM, demonstramos que a administração precoce de piridostigmina, iniciando-se logo após a ligadura da artéria coronariana em ratos normotensos (Wistar) e mantida por 7 dias, se associou 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 (27,28). Nesses estudos, não foi avaliado se a piridostigmina tem alguma influência, mesmo que de forma indireta, sobre metabolismo energético. Ainda de acordo com dados do nosso laboratório, o protocolo de tratamento com piridostigmina inibe aproximadamente 40% da atividade plasmática da acetilcolinesterase (117).

1.6 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Do exposto, fica claro que o IAM compromete o equilíbrio do meio interno causando alterações fisiopatológicas relacionadas a *pelo menos* 4 condições associadas: alterações hemodinâmicas (IC), desequilíbrio simpato-vagal no controle reflexo cardiovascular, resposta inflamatória e perfusão cerebral. O uso de fármacos que aumentam a atividade colinérgica (anticolinesterásicos) se mostrou efetivo na

redução da atividade inflamatória, na melhora de alguns parâmetros de função ventricular na fase aguda após IAM e no balanço autonômico cardíaco. Entretanto, não se investigou o quanto essas drogas interferem no metabolismo energético miocárdico e cerebral diante das mudanças hemodinâmicas, autonômicas, inflamatórias e no sistema nervoso central. Considerando-se que a piridostigmina é uma droga de ação periférica (não atravessa a barreira hematoencefálica) com efeitos terapêuticos positivos sobre o coração infartado, pode-se inferir que a mesma, *melhorando* a função cardíaca localmente e/ou por meio de ativação da via colinérgica anti-inflamatória, otimize o metabolismo miocárdico e cerebral.

A ideia central do trabalho é a de que a melhora da função miocárdica pela piridostigmina melhore o rendimento metabólico cardíaco e cerebral.

O presente trabalho visa quantificar alterações locais e sistêmicas no IAM e a interação coração-cérebro do IAM; determinar se a regulação cardíaca e imunológica pelo nervo vago estariam associadas antes e depois da estimulação colinérgica; identificar padrões de resposta dependentes do efeito periférico de um fármaco.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do anticolinesterásico, brometo de piridostigmina, sobre parâmetros hemodinâmicos, autonômicos, inflamatórios e do metabolismo da glicose nos tecidos cardíaco e cerebral avaliado pelo ^{18}F -FDG PET-scan, em ratos SHR infartados.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito do uso de piridostigmina por 7 dias pós-IAM em ratos SHR, sobre:

- a) Aspectos morfofuncionais do coração por meio de ecoDopplercardiografia, e quantificação de variáveis hemodinâmicas por meio de registro de medida de pressão arterial invasiva;
- b) Aspectos funcionais do sistema nervoso autônomo por meio da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e da variabilidade da pressão arterial (VPA);
- c) A expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias no tecido ventricular esquerdo (TNF- α , IL -1 β , IL-10, IL-13 e IL-17-A);
- d) O metabolismo cardíaco e cerebral quantificado pela captação miocárdica e cerebral de ^{18}F -FDG PET-scan em ratos SHR infartados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram executados de acordo com o *Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals* [National Institutes of Health (NIH) Publication No. 85-23, Revised 1985]. O projeto de pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE), protocolo número 7612011118. Também foram observados os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, de outubro de 2008.

3.1. ANIMAIS

Ratos SHR machos adultos (12 a 15 meses de idade, peso 200-300g) foram acomodados em gaiolas plásticas coletivas (4 animais por gaiola), em ambiente com temperatura controlada (23°C), com um ciclo de 12 horas escuro/luz e ração e água *ad libitum*. Os ratos foram submetidos a ligadura da artéria coronária esquerda e randomicamente distribuídos em 3 grupos: Grupo SHAM (ratos operados – cirurgia sham), n=16; Grupo IAM sem tratamento (controle IAM), n=19; Grupo IAM+PI (ratos infartados tratados com piridostigmina), n=18. Todos os animais foram monitorados durante um tempo total de 7 dias. Ratos do Grupo IAM+PI receberam o anticolinesterásico Piridostigmina (DCB 07161) na dose de 40mg/kg/dia por gavagem, 1 vez ao dia, durante 7 dias.

3.2. MODELO EXPERIMENTAL DE INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

A ligação da artéria coronária descendente é o método de indução de infarto (Figura 8) mais comum para pequenos animais, e vem sendo utilizado pelo menos

desde 1954 (Johns TN, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals Ann Surg 1954; 140: 675–82). As linhagens mais usadas são Wistar e Sprague-Dawley, com animais tendo peso entre 200 e 250 g, o que corresponde a um animal adulto jovem e apresentam mortalidade menor que em animais mais velhos. É importante que os animais utilizados sejam do mesmo sexo, pois esta variável é um fator importante nas adaptações cardíacas em resposta a diferentes estímulos (Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model. Leonardo A. M. Zornoff; Sergio A. R. Paiva; Marcos F. Minicucci; Joel Spadaro. Arq. Bras. Cardiol. vol.93 no.4 São Paulo Oct. 2009 <http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2009001000018>. Além disso, a acomodação e a manutenção de ratos são de custos bem mais baixos em relação a animais maiores e possibilita aumentar o número de animais em determinados estudos, promovendo maior poder estatístico. Também permite o uso de avanços tecnológicos de diversos tipos como ecocardiografia, exames de imagem, cateteres e outros; também possibilita o uso de análises postmortem como técnicas histológicas e de biologia molecular. A literatura corrente refere-se ao modelo como modelo de sucesso e amplamente usado tanto na pesquisa básica como na translacional (Small Animal Models of Heart Failure Development of Novel Therapies, Past and Present. Richard Patten RD, Hall-Porter MR. Circ Heart Fail. 2009; 2:138-144).

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 (Gelco-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 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. 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.

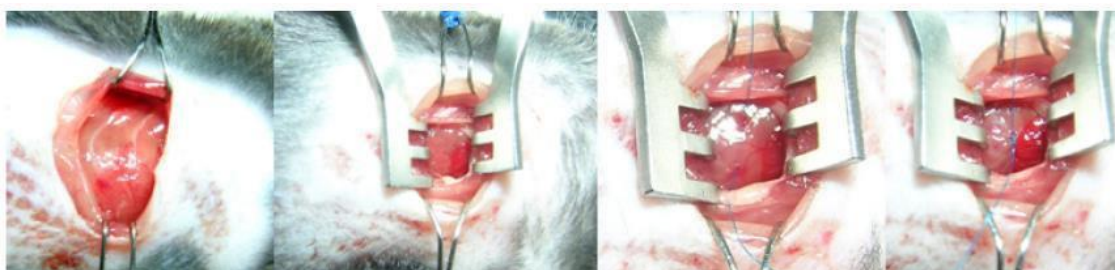


Figura 8. Indução do infarto agudo do miocárdio por ligadura da artéria coronária. Fonte:arquivo do grupo de trabalho.

3.3. CANULAÇÃO

Os animais foram anestesiados com Ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (12 mg/kg) e mantidos em mesa cirúrgica aquecida (37° C), utilizando de 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 PA e frequência cardíaca. A extremidade conectada ao transdutor de pressão foi fechada com pinos de aço inoxidável. Através de uma pequena incisão na região inguinal esquerda em direção ao feixe vasculonervoso femoral, as extremidades da cânula de

menor calibre (PE-10) foram introduzidas na luz da artéria femoral. A cânula foi fixada com fio de algodão na artéria e sua extremidade mais calibrosa passada no subcutâneo, exteriorizadas no dorso da região Inter escapular, fixadas com fio de algodão na pele. Após o término da cirurgia os animais foram tratados com uma única injeção de penicilina (Benzetacil1, Fontoura-Wyeth, 60.000 U). Para a manutenção da cânula, a fim de se evitar obstruções, foi feita lavagem precedente 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) até a sua eutanásia.

3.4. MEDIDAS HEMODINÂMICAS

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 (Kent Instruments, EUA) que, por sua vez, era conectada a um pré-amplificador (Hewlet-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,

forneendo os valores de pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) pela integral da área sob a curva no tempo. A frequência cardíaca é 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 são apresentados em valores médios e erros padrões dos períodos em que os dados forem analisados para PA e FC.

3.5. ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA (VFC)

Os parâmetros para análise da VFC no domínio do tempo consistem em calcular os valores médios dos intervalos 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, elevados ao quadrado (rMSSD), que representa a atividade parassimpática; e o desvio padrão de todos os intervalos RR normais gravados em um intervalo de tempo (SDNN), obtido a partir de registros de longa duração e que representa as atividades simpática e parassimpática, porém não permite distinguir quando as alterações da VFC são devidas ao aumento do tônus simpático ou à retirada do tônus vagal. Para a análise no domínio da frequência, foi realizada a análise espectral dos registros basais utilizando o método da Transformada Rápida de Fourier (FFT). A potência foi obtida usando-se o Método do Periodograma de Welch em séries de 16384 pontos das séries temporais decimadas de intervalo de pulso e pressão arterial, com uma janela Hanning de 512 pontos e com 50% de sobreposição (MATLAB 6.0, Mathworks, Inc.). 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) maiores que 0.5 foram considerados significativos.

3.6. ECODOPPLERCARDIOGRAMA

Procedimento realizado no sexto dia após o infarto do miocárdio ou cirurgia sham, com a finalidade de mensurar a área infartada e fração de ejeção e cálculo dos seguintes parâmetros: espessura relativa de parede (RWT, *relative wall thickness*), razão onda E onda A (E/A), razão onda E'onda A'(E'/A'), tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV, ms), E/TRIV (razão onda E/TRIV), índice de *performance* miocárdica (MPI, *myocardial performance index*), AE (átrio esquerdo, em mm), AO/AE (razão aorta/átrio esquerdo), VES diam (diâmetro final ventricular esquerdo durante a sístole, mm²), VED diam (diâmetro final ventricular esquerdo durante a diástole, mm²), VES vol (volume sistólico final do VE, ul), VED vol (volume diastólico final, ul), VES área (área ventricular esquerda durante a sístole, mm²), VED área (área ventricular esquerda durante a diástole, mm²), VE massa (massa ventricular esquerda, g/Kg), VEFE% (fração de ejeção do ventrículo esquerdo, %), VE FAC (%) (variação fracional da área ventricular esquerda, %) como descrito a seguir e com mais detalhes na literatura (28,118).

O exame ecocardiográfico foi realizado para a quantificação da área infartada e avaliação de parâmetros morfuncionais, em especial, a função ventricular, de acordo

com a técnica já padronizada em nosso laboratório. Após anestesia com uma solução intraperitoneal de 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 02 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 VE. A função sistólica foi avaliada pela fração de ejeção (FE%) pelo método 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 volume amostra 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 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.

3.7. PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE mRNA DE CITOCINAS NO CORAÇÃO.

PCR em tempo real foi realizada para avaliar a expressão de MCP-1, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-13, IL-17A e IL-10. Os *primers* específicos para esses genes foram desenhados utilizando-se o Primer-Blast do NCBI (National Center for Biotechnology Information).

O RNA total foi extraído do ventrículo esquerdo, utilizando o método de Trizol (Invitrogen, CA, USA), conforme protocolo indicado pelo fabricante. A quantidade e pureza de RNA foi medida usando o espectrômetro NanoDrop ND-2000 (nanoDrop Products, Wilmington, DE, USA). O cDNA, foi sintetizado usando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Invitrogen, Califórnia, EUA). Após a reação, as amostras de cDNA foram mantidas a -20°C. Para realização da PCR em tempo real foi utilizado o kit SYBR Green (Invitrogen, Califórnia, EUA). Ciclos (40) de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e curva de *melting* foram realizados no equipamento 7500™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Califórnia EUA). Os genes diferencialmente expressos foram normalizados pelo nível de expressão do gene housekeeping β -actina. Os valores de Δ Ct das amostras foram

determinadas pela subtração do valor de Ct médio do mRNA do gene alvo a partir do valor médio de Ct do gene housekeeping. O parâmetro $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi utilizado para expressar os dados da expressão relativa.

Os *primers* para detecção de mRNA de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A e MCP-1 estão na tabela 1 a seguir:

Tabela 1. Lista dos *primers* utilizados na expressão gênica de citocinas do ventrículo esquerdo.

Nome do oligonucleotídeo	Sequência	Escala de síntese	Purificação	
TNF α R sense	CTCAAGCCCTGGTATGAGCC	25N	Dessalinizado	DSL
TNF α R antisense	CTCCAAAGTAGACCTGCCCCG	25N	Dessalinizado	DSL
IL-1beta R sense	AAATGCCTCGTGCTGTCTGA	25N	Dessalinizado	DSL
IL-1beta R antisense	GCTGTTTTAGGGACACCGGA	25N	Dessalinizado	DSL
IL-6 R sense	AGCGATGATGCACTGTCAGA	25N	Dessalinizado	DSL
IL-6 R antisense	GGAAGTCCAGAAGACCAGAGC	25N	Dessalinizado	DSL
IL-13 R sense	CCTGGAATCCCTGACCAACA	25N	Dessalinizado	DSL
IL-13 R antisense	ATCCGAGGCCTTTTGGTTACA	25N	Dessalinizado	DSL
IL-17A R sense	CAAACGCCGAGGCCAATAAC	25N	Dessalinizado	DSL
IL-17A R antisense	GGGTGAAGTGGAACGGTTGA	25N	Dessalinizado	DSL
IL-10 R sense	TTGAACCACCCGGCATCTAC	25N	Dessalinizado	DSL
IL-10 R antisense	CCAAGGAGTTGCTCCCGTTA	25N	Dessalinizado	DSL
BACTIN RM sense	5' - AGGAGTACGATGAGTCCGGCCC - 3'	25N	Dessalinizado	DSL
BACTIN RM antisense	5' - GCAGCTCAGTAACAGTCCGCCT - 3'	25N	Dessalinizado	DSL

3.8. PROTOCOLO PARA REALIZAÇÃO DE IMAGEM PET – ^{18}F -FDG DO CÉREBRO E DO CORAÇÃO

Os exames de imagem PET (*positron emission tomography*) foram realizados no InRAD – Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, em São Paulo – SP. No sétimo dia após a indução de IAM, depois de mantidos em jejum por 3 horas, os animais foram devidamente acondicionados para o transporte e levados do biotério do InCOR – Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo - SP até o InRAD (Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo – SP).

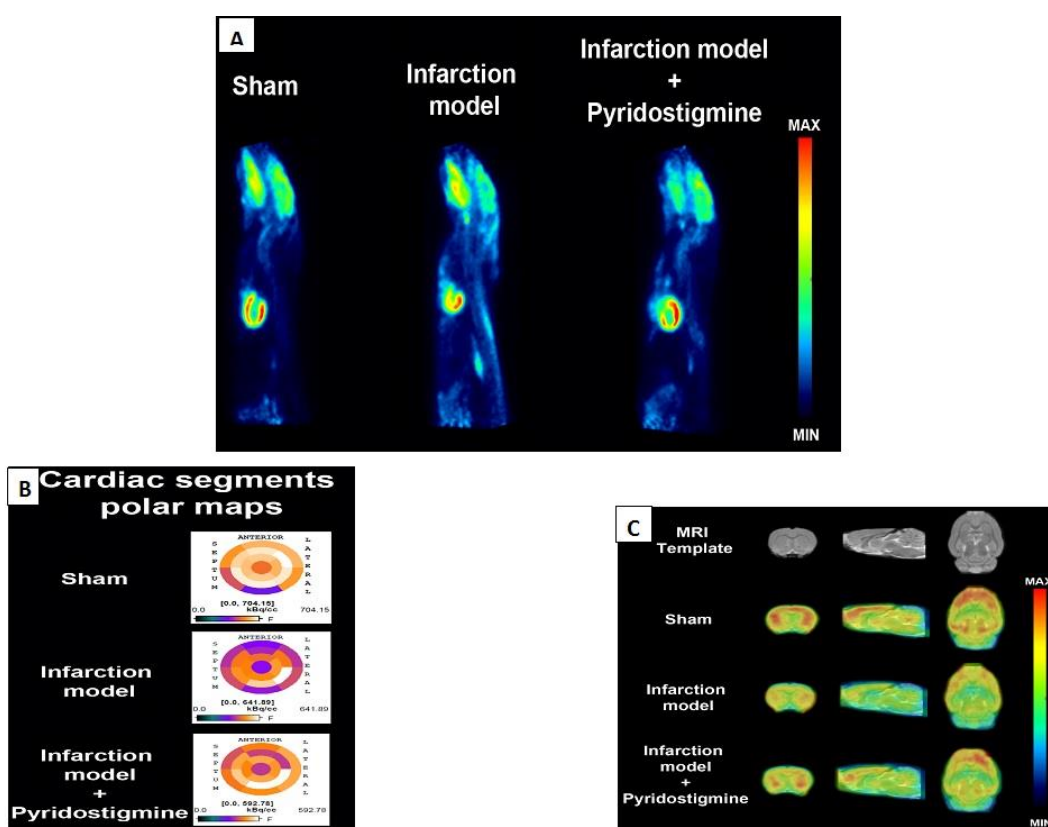


Figura 9. Análise do metabolismo cardíaco e cerebral com a técnica de Pet-Scan. (A) Captação corporal do traçador, “body uptake”; (B) Mapas segmentares cardíacos usados para definição das áreas afetadas pelo infarto; (C) Montagem das imagens usando o template da ressonância magnética.

Fonte: InRAD, Instituto de Radiologia da USP, julho de 2019.

As imagens PET com o radiofármaco ^{18}F -FDG foram adquiridas em um equipamento específico para pequenos animais (Triumph® II Trimodality System Gamma medica ideas). Durante todos os procedimentos os animais foram anestesiados (isoflurano 2-3% em oxigênio 100%). Uma injeção intravenosa de ± 1 mCi (37 MBq) do ^{18}F -FDG foi realizada na veia peniana. A aquisição da imagem PET foi iniciada 45 minutos após a administração do ^{18}F -FDG, e cada aquisição teve uma duração de 60 minutos. O encéfalo foi posicionado no centro do campo de visão do equipamento PET. A cada 10 minutos de aquisição da imagem a maca se movia automaticamente para dentro do equipamento para aquisição de imagem de uma nova região, garantindo assim uma imagem única da região do encéfalo e do coração do rato estudado. As imagens foram reconstruídas com algoritmo OSEM 3D, 20 iterações e 4 subgrupos.

As imagens PET foram analisadas utilizando *software* PMOD 3.4® a partir da fusão com o template de ressonância magnética, no caso do encéfalo (Figura 9 C) ou no módulo cardíaco. Após a fusão de imagens, utilizou-se as ferramentas de análise do *software* com os VOIs (*Volumes of interesting*) cerebrais específicos do rato, disponíveis no *software*. Os dados estão expressos em Valor de Captação Padronizado, o SUV (*Standard Uptake Value*) ou % de captação para os de metabolismo cardíaco para cada região de interesse. A fórmula para cálculo do SUV é: $\text{SUV} = [\] \text{ KBq/ml} / \text{DI/peso (g)}$, onde: kBq = kilobecquerel; ml = mililitros; DI= dose injetada; g = gramas.

O SUV é uma avaliação semiquantitativa da captação do radiotraçador a partir da imagem PET estática, sendo representado como mínima, máxima ou média na região de interesse. A média SUV representa a média matemática de todos os pixels

na região de interesse, fornecendo uma informação semiquantitativa do metabolismo da glicose nos tecidos, corrigido pela atenuação, e normalizado pela dose injetada e pelo peso do paciente, na maioria dos casos. Permite comparações entre diferentes imagens e indivíduos, no entanto sem levar em conta a proporção de captação do traçador livre no tecido ou da captação devido a ligação não específica. Um SUV=1 indica que a concentração de radioatividade em um tecido é aquela que ocorreria em uma captação homogênea por toda a parte do corpo (presumindo uma densidade corporal de 1g/mL). Um SUV maior que 1 indica acúmulo do traçador; abaixo de 1, captação ou aporte limitados dentro de um tecido particular (108).

As variáveis analisadas no PET cerebral foram 84 SUVs de um total de 59 VOIs, que representam as áreas cerebrais disponíveis no *software*. Esta discrepância entre o número de SUVs e o número de VOIs, deve-se ao fato de nos registros dos SUVs são também elencadas as médias entre 2 regiões homônimas. Por exemplo Nucleus accumbens direito, Nucleus accumbens esquerdo e Nucleus accumbens média geram 3 SUVs, mas que correspondem somente a 2 regiões, a direita e a esquerda.

No PET miocárdico, depois da reconstrução das imagens (*software*), foram obtidos cortes reorientados para o eixo de correção em 3 planos: eixo curto – corte axial, do apex para a base; eixo longo vertical – corte sagital, do septo para a parede lateral; eixo longo horizontal – corte coronal, da parede inferior para a anterior.

A captação no PET coração foi analisada (escores) de acordo com a divisão do miocárdio (Figuras 9 C e 10) em parede anterior, septal, inferior, lateral e apical, e conforme o território arterial envolvido: artéria descendente anterior LAD (*left anterior descending*), artéria coronária direita RCA (*right coronary artery*), artéria circunflexa LCX (*circumflex artery*) e global. Por exemplo, LAD 1 basal anterior, LAD 2 basal anteroseptal e assim por diante; ver figura 10). Foram usadas a nomenclatura e a

segmentação miocárdica padronizadas para imagem tomográfica do coração (119): desta forma, pode-se inferir qual segmento recebe a irrigação das diferentes artérias. Eixos, nomenclatura e a segmentação miocárdica permitem a avaliação visual das imagens.

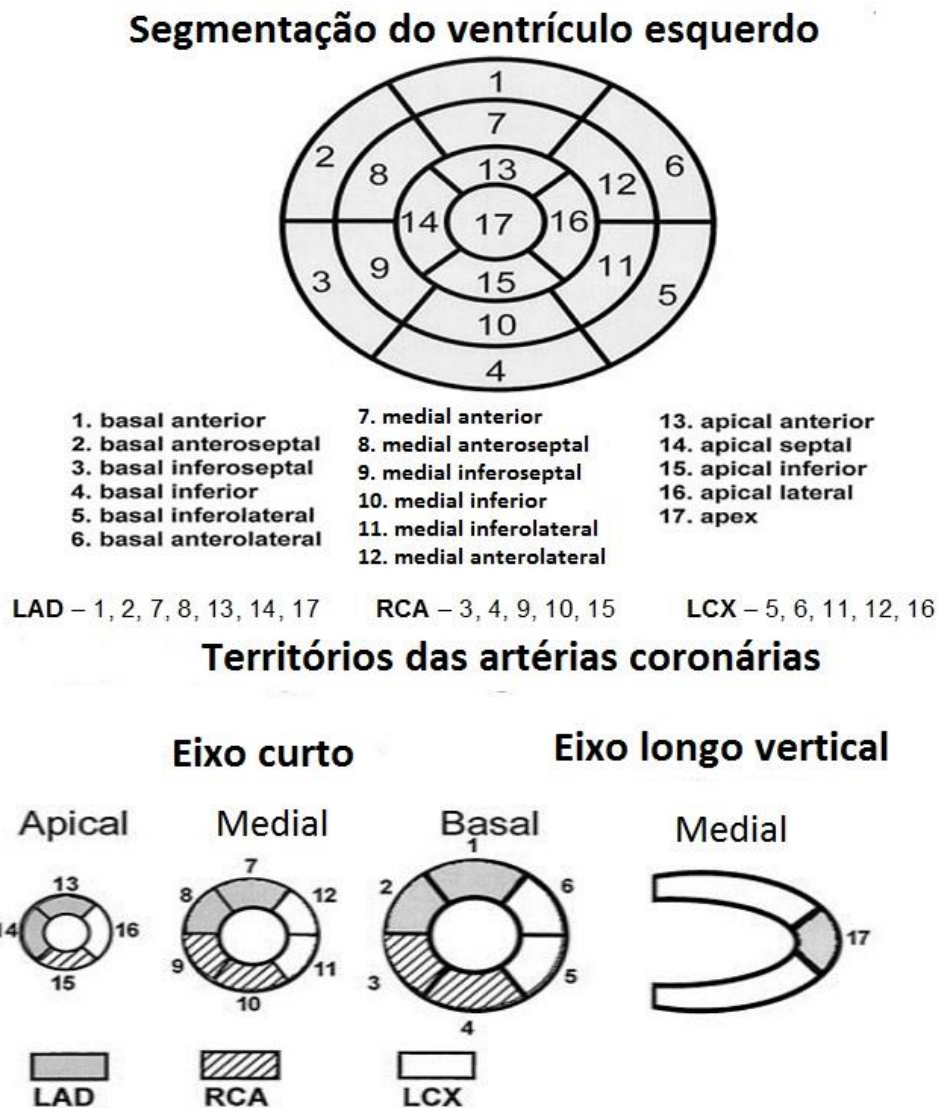


Figura 10. (A) Divisão miocárdica em 17 segmentos, com (B) os territórios arteriais correspondentes. *In: Cerqueira MD et al., 2002.* LAD: Artéria descendente anterior; RCA: Artéria comum direita; LCX: Artéria circunflexa (119).

3.9. EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS

Decapitação – por causa da rapidez e eficiência. Método usado principalmente por pesquisadores que trabalham com o SNC (Eutanásia em animais de laboratório.

Ekaterina

Akimovna

Botovchen

Rivera.

[http://www.fo.usp.br/wpcontent/uploads/EUTANASIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO.pdf](http://www.fo.usp.br/wpcontent/uploads/EUTANASIA_EM_ANIMAIS_DE_LABORATORIO.pdf)

Os subgrupos de animais direcionados ao estudo de citocinas do miocárdio e cérebro foram submetidos à eutanásia por decapitação. O procedimento foi realizado por técnico capacitado, segundo princípios éticos da experimentação animal. Após a decapitação, foram realizados toracotomia, laparotomia e craniectomia e retirados o coração, os rins e o cérebro; o ventrículo esquerdo e os rins foram separados e colocados em nitrogênio líquido para posterior preparo para quantificação proteica (ELISA). O cérebro foi removido e pós-fixado por 48 horas em paraformaldeído e crioprotetido com 20% e 30% sucrose em 0,01 M PBS (24 horas em cada solução).

Os outros subgrupos de animais foram submetidos à eutanásia por meio de dose letal de anestésico e a seguir submetidos à perfusão do coração e rins, para posterior análise de imuno-histoquímica. Foi utilizada a clorpromazina (medicação pré-anestésica) na dose de 50 mg/kg (intramuscular), e em seguida administrado pentobarbital na dose de 50 a 80 mg/K. O monitoramento constante do animal até a ausência de reflexos oculopalpebrais e sensitivos foi realizado para garantir a total anestesia dos animais, logo então 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), para processamento (por desidratação, diafanização e parafinização do material) e posteriormente cortados em micrótomo (5 μ m). Após o experimento, os animais foram armazenados em sacos leitosos com identificação, refrigerados e encaminhados à incineração.

4.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos resultados foi realizada com o programa GraphPad Prism®, versão 8 para Windows, 2020, da GraphPad Software, San Diego, California. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para todos os testes estatísticos foi considerado $p < 0,05$ estatisticamente significativo. Todas as variáveis foram apresentadas em média e desvio padrão. Para a comparação entre grupos foi usado ANOVA de 1 via (ANOVA One - Way), seguida de teste *post hoc* de Bonferroni.

4. RESULTADOS

As tabelas abaixo mostram os valores expressos em média e desvio padrão e valor de $p < 0,05$ estatisticamente significante para a comparação entre os grupos (ANOVA One - Way) e intergrupos (Bonferroni). A análise *post hoc* (Bonferroni) é exibida em figuras com barras. A variabilidade dos n_s nas tabelas deve-se a fatores como mortalidade, logística e disponibilidade na realização dos diferentes procedimentos.

As medidas hemodinâmicas dos ratos SHR realizadas no sexto dia depois da toracotomia são mostradas na Tabela 2. A PAS, a PAD e a PAM (figuras 11, 12 e 13) apresentaram uma significativa diminuição nos grupos IAM e IAM+PI quando comparados ao grupo Sham, mostrando o efeito hipotensor do infarto. Essa queda nos valores da PAS, PAD e PAM não foi afetada pela piridostigmina no grupo IAM+PI versus grupo IAM. A FC não apresentou diferenças estatisticamente significantes.

Tabela 2 – Comparação das médias dos parâmetros hemodinâmicos entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI

	Sham (n=16)	IAM (n=19)	IAM+PI (n=18)	p entre grupos
PAS (mmHg)	204 ± 8,2	174 ± 21,6 [#]	167 ± 13,5 [€]	0,001*
PAD (mmHg)	144 ± 8,4	126 ± 14,8 [#]	118 ± 10,9 [€]	0,001*
PAM (mmHg)	172 ± 8,1	149 ± 17,8 [#]	142 ± 11,6 [€]	0,001*
FC (bpm)	376 ± 28,1	392 ± 27,9	369 ± 39,6	0,999

* $P < 0,05$ (ANOVA) estatisticamente significante. PAS = Pressão Arterial Sistólica, PAD = Pressão Arterial Diastólica, PAM = Pressão Arterial média, FC = Frequência cardíaca.

[#] $p < 0,05$ IAM vs Sham; [€] $p < 0,05$ IAM+PI vs Sham.

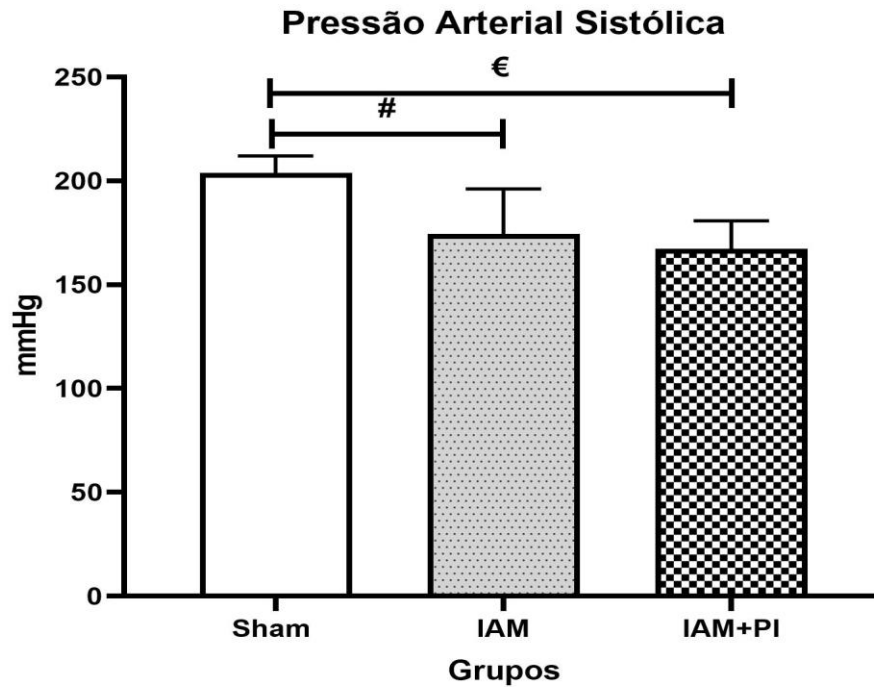


Figura 11 – Comparação das médias de Pressão Arterial Sistólica entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

$p = 0,001$ IAM vs Sham; € $p = 0,001$ IAM+PI vs Sham.

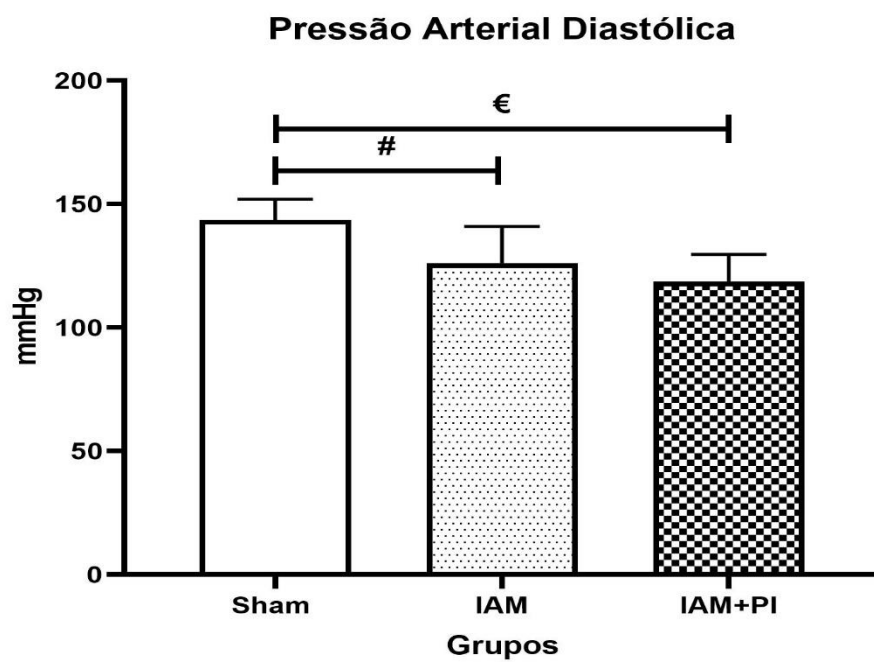


Figura 12 – Comparação das médias de Pressão Arterial Diastólica entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI. # $p = 0,001$ IAM vs Sham; € $p=0,001$ IAM+PI vs Sham.

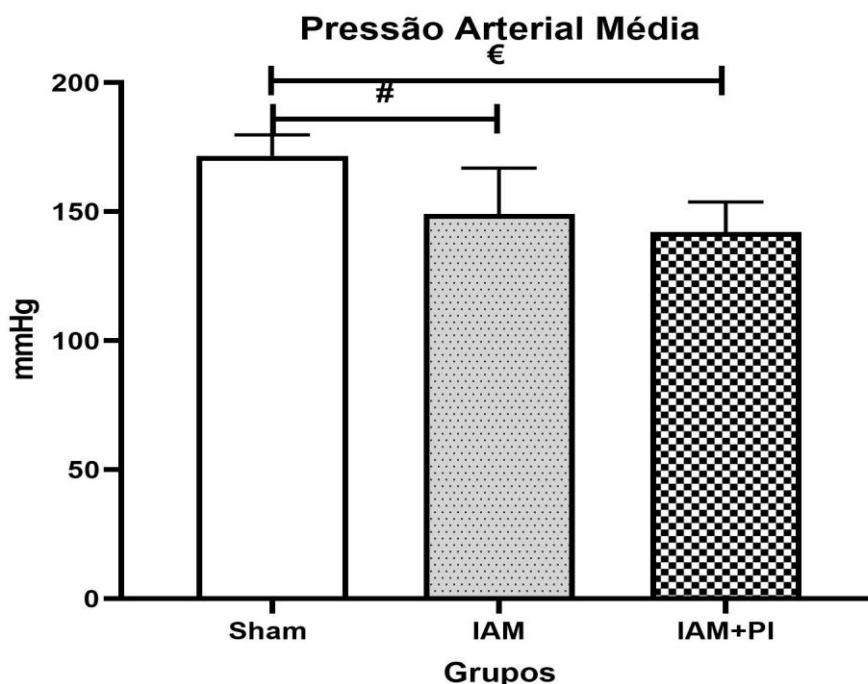


Figura 13 – Comparação das médias de Pressão Arterial Média entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI. # $p=0,001$ IAM vs Sham; € $p=0,001$ IAM+PI vs Sham.

As análises da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) nos domínios do tempo e da frequência e da variabilidade da pressão arterial sistólica (VPAS) são mostradas na Tabela 3.

No domínio do tempo, houve aumento significativo do RMSSD e da VARPI no grupo IAM+PI em relação aos grupos IAM e ao grupo Sham (RMSSD: IAM+PI vs Sham $p=0,008$ e IAM+PI vs IAM $p=0,005$; VARPI (IAM+PI vs Sham $p=0,001$ e IAM+PI vs IAM $p=0,001$) (Figuras 14 e 15), *id est*, um aumento na VFC, inclusive com valores mais elevados no grupo IAM+PI do que no grupo Sham, evidenciando um efeito robusto da piridostigmina. No domínio da frequência, o valor BF% aumentou (% simpático) (Figura 16) e o AF% diminuiu (%parassimpático) (Figura 17) no grupo IAM em relação ao grupo Sham, o que evidencia um predomínio da atividade simpática nos animais infartados. O valor normalizado de BF (nu)

permaneceu aumentado, mas o valor de AF (nu) mostrou incremento significativo no grupo IAM+PI vs IAM ($p=0,003$ e $p=0,001$, respectivamente) e no grupo IAM+PI vs Sham ($p=0,002$ e $p=0,001$, respectivamente) (Figuras 18 e 19, respectivamente), melhorando, portanto, a atividade vagal no rato tratado com piridostigmina. O balanço autonômico BF/AF mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos IAM e Sham, essa diferença não sendo observada no grupo tratado em relação aos dois outros grupos (Figura 20). Tanto a VARPAS (Figura 21) quanto a PAS (Figura 22) mostraram um decremento em seus níveis no grupo IAM vs Sham, efeito que se repetiu no grupo IAM+PI vs Sham, indicando que a queda na variabilidade da pressão arterial sistólica nos ratos infartados não foi atenuada com a piridostigmina. O índice-ALFA teve seu valor aumentado no grupo tratado vs grupo Sham ($p=0,026$) e no grupo tratado vs grupo infartado ($p=0,007$) (Figura 23), indicando um efeito acentuado da piridostigmina sobre a sensibilidade do barorreceptor.

Tabela 3. Comparação das médias dos parâmetros autonômicos (variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e variabilidade da pressão arterial (VPAS)) no domínio do tempo e no domínio da frequência entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

	Sham (n=10)	IAM (n=8)	IAM+PI (n=10)	p entre grupos
VFC				
RR (ms)	164 ± 14,5	149 ± 18,3	160 ± 20,1	0,227
RMSSD (ms)	6,2 ± 2,0	5,8 ± 2,2	9,3 ± 2,0 € ^Ω	0,002*
VARPI (ms²)	28,5 ± 13,0	15,8 ± 6,0	63 ± 28,1 € ^Ω	0,001*
BF%	19,4 ± 7,4	29,3 ± 7,3 [#]	23,8 ± 6,8	0,035*
AF%	80,6 ± 7,4	68,3 ± 9,8 [#]	76,2 ± 6,8	0,012*
BF (nu)	2,6 ± 2,0	2,5 ± 1,0	7,8 ± 4,5 € ^Ω	0,001*
AF (nu)	9,7 ± 3,6	6,0 ± 3,0	23,9 ± 8,7 € ^Ω	0,001*
BF/AF (ms)	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,2 [#]	0,4 ± 0,2	0,035*
VPAS				
VARPAS (mmHg²)	57,8 ± 18,5	28,6 ± 12,1 [#]	32,1 ± 14,0 €	0,007*
PAS (mmHg)	205,4 ± 13,7	178,3 ± 26,3 [#]	169,6 ± 21,5 €	0,002*
BF (mmHg²)	14,8 ± 8,3	11,2 ± 8,0	8,3 ± 4,7	0,167
Índice – ALFA (ms/mmHg)	0,5 ± 0,3	0,6 ± 0,2	1,1 ± 0,5 € ^Ω	0,005*

***P<0,05** (ANOVA) estatisticamente significante. VFC: variabilidade da frequência cardíaca; RR: medida dos intervalos RR; RMSSD: raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças entre os sucessivos valores de intervalo de pulso; VARPI: variância do intervalo de pulso; BF % e AF %: baixa frequência e alta frequência, respectivamente; BF nu: baixa frequência em unidades normalizadas; AF nu: alta frequência em unidades normalizadas; BF/AF: balanço autonômico; VARPAS: variabilidade da pressão arterial sistólica; PAS: pressão arterial sistólica.

[#]p<0,05 IAM vs Sham; € p<0,05 IAM+PI vs Sham; ^Ωp<0,05 IAM+PI vs IAM

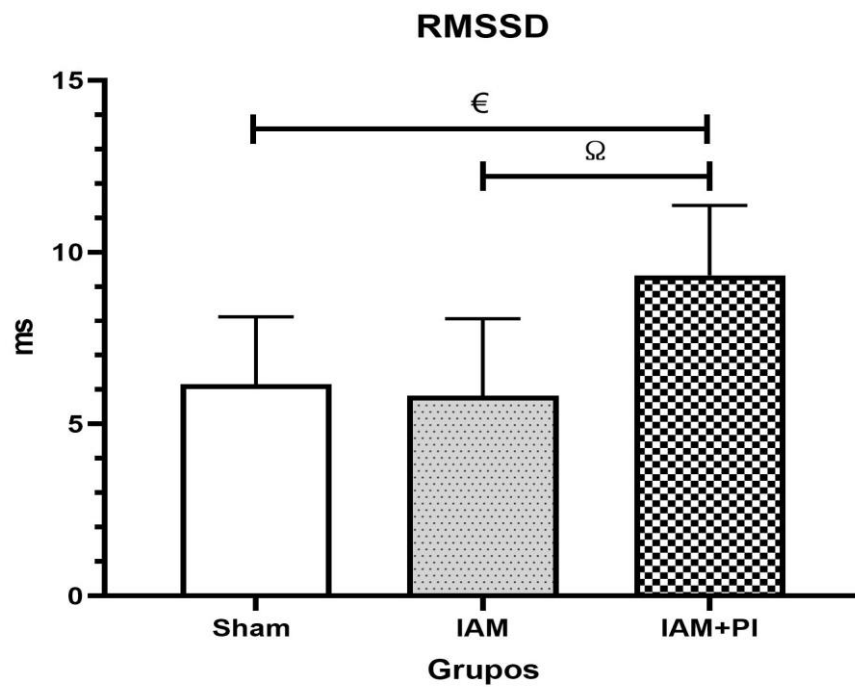


Figura 14 – Comparação das médias da raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes (**RMSSD**) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

€ $p=0,008$ vs Sham; Ω $p=0,005$ vs IAM.

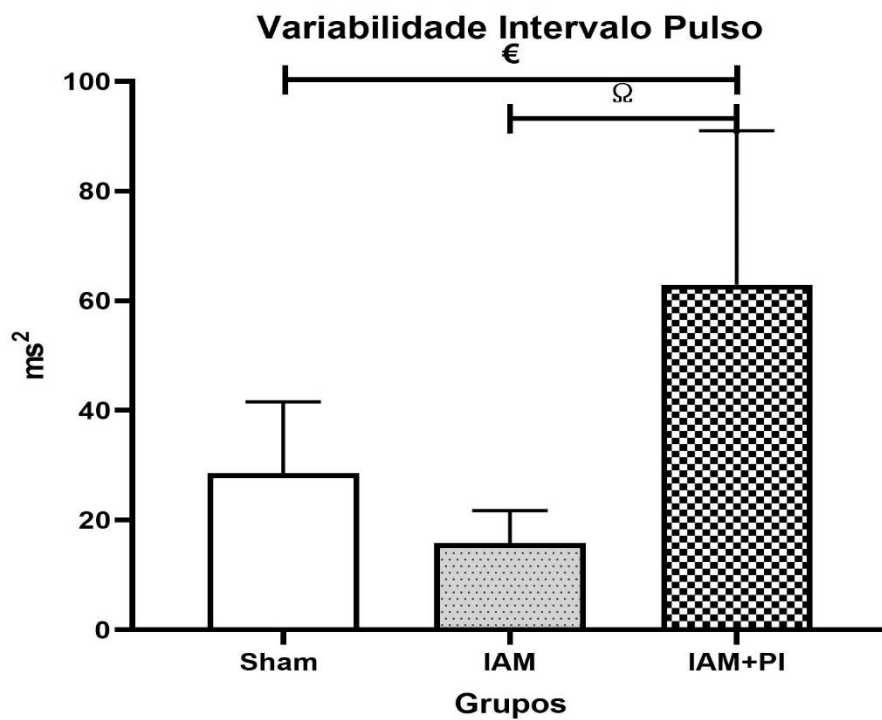


Figura 15 – Comparação das médias da variabilidade do intervalo de pulso (VARPI) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

€ $p=0,008$ vs Sham; Ω $p=0,005$ vs IAM.

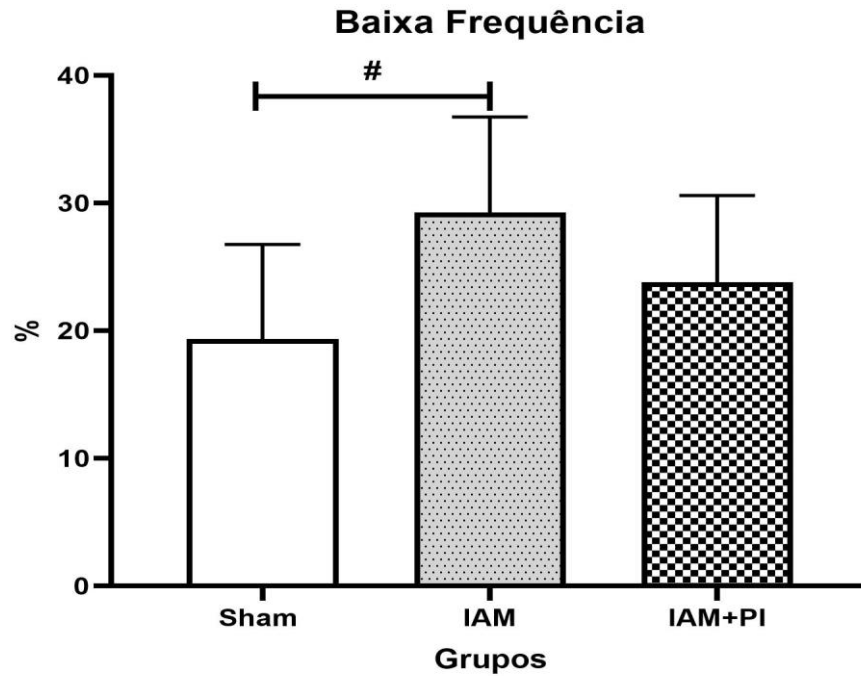


Figura 16 – Comparação das médias do percentual do componente de baixa frequência (**BF**) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI. $^{\#}p=0,031$ vs Sham.

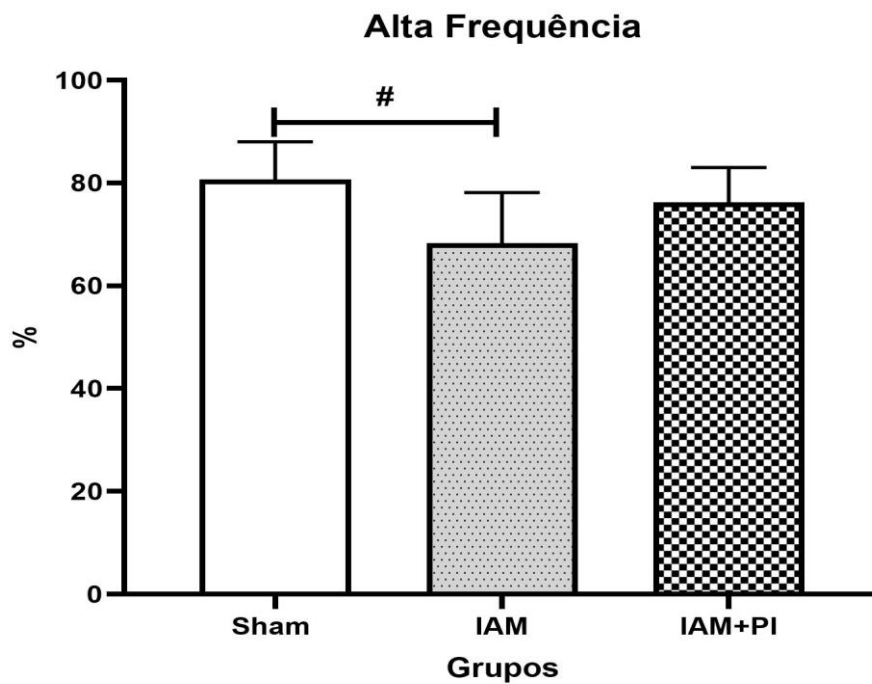


Figura 17 – Comparação das médias do percentual do componente de alta frequência (**AF**) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI. $^{\#}p=0,010$ vs Sham.

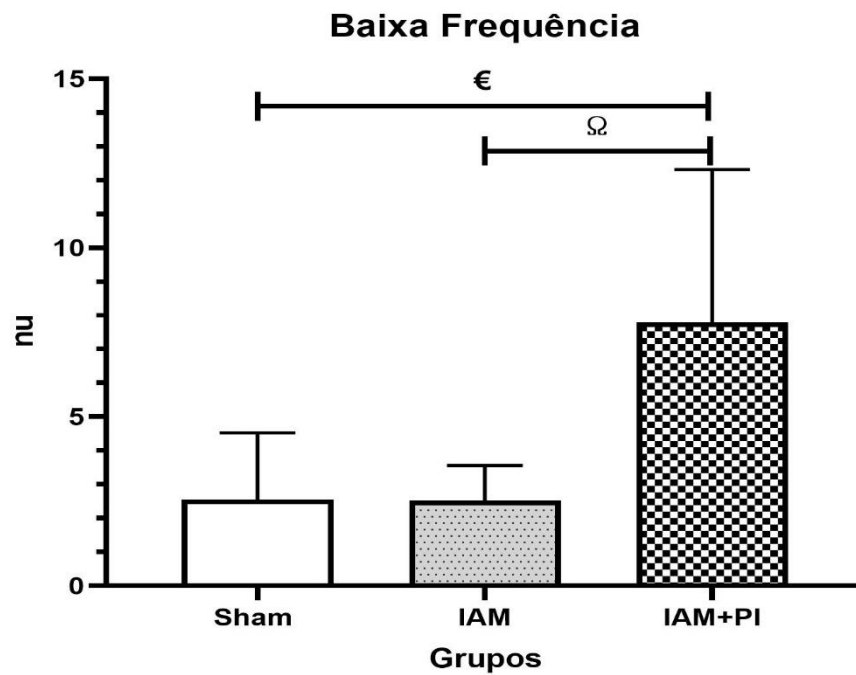


Figura 18 – Comparação das médias dos valores normalizados do componente de baixa frequência (**BF**) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.
 $^{\epsilon}p=0,008$ vs Sham; $^{\Omega}p=0,005$ vs IAM.

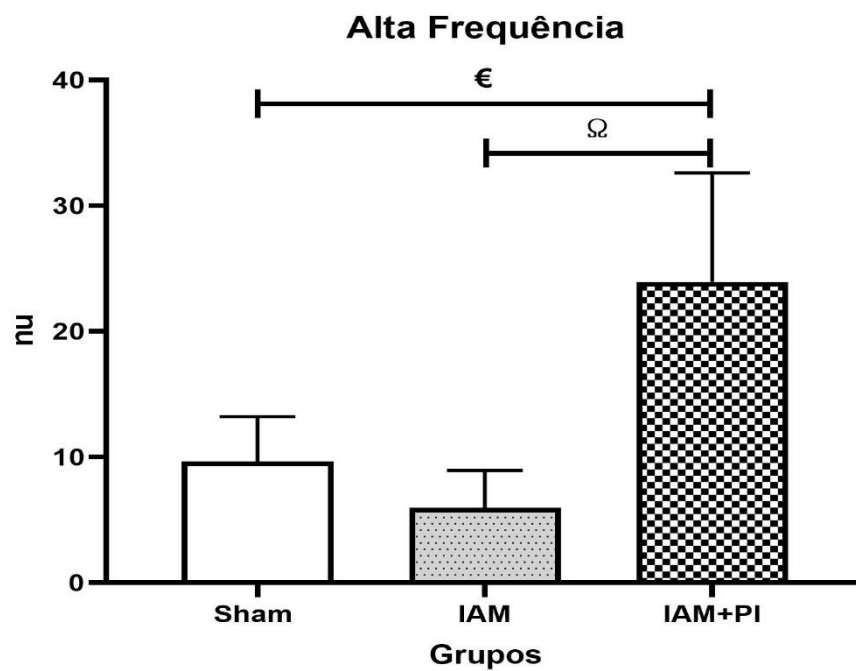


Figura 19 – Comparação das médias dos valores normalizados do componente de alta frequência (**AF**) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.
 $^{\epsilon}p=0,008$ vs Sham; $^{\Omega}p=0,005$ vs IAM.

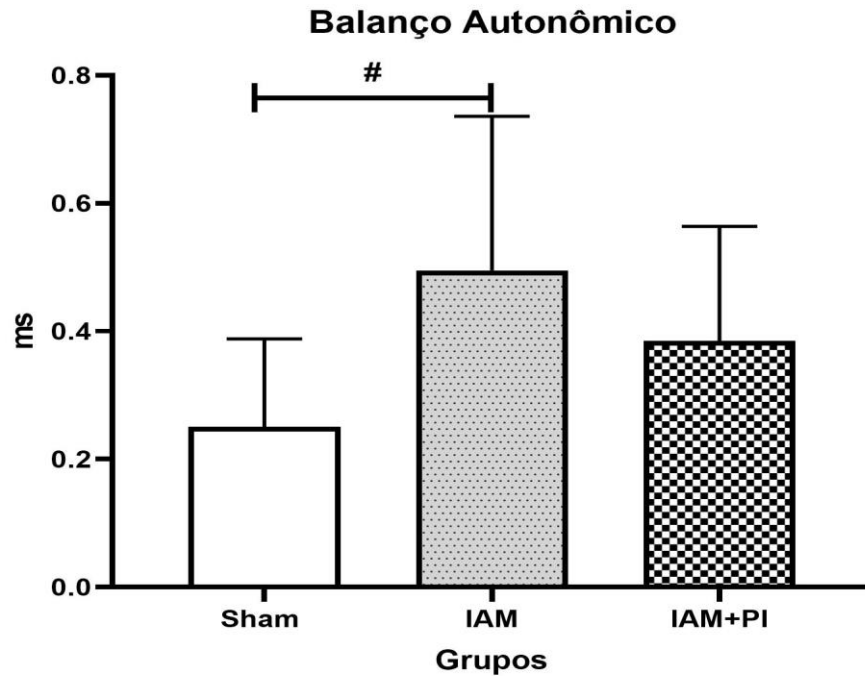


Figura 20 – Comparação das médias do balanço autônomo (**razão BF/AF**) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.
 $^{\#}p=0,032$ vs Sham.

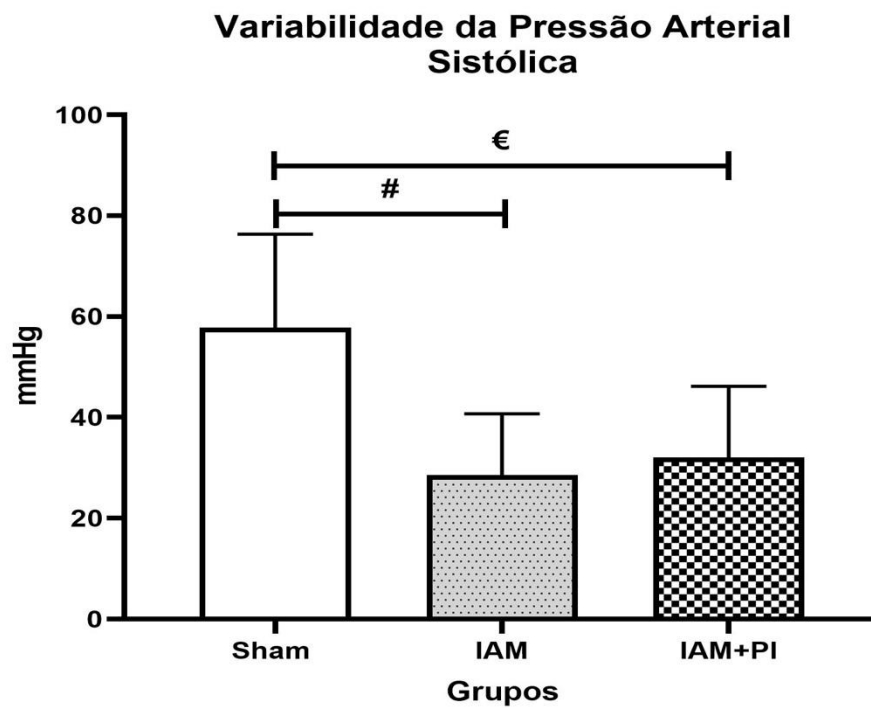


Figura 21 – Comparação das médias da variabilidade de pressão arterial sistólica (**VARPAS**) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.
 $\#p=0,001$ vs Sham; $\epsilon p=0,004$ vs Sham.

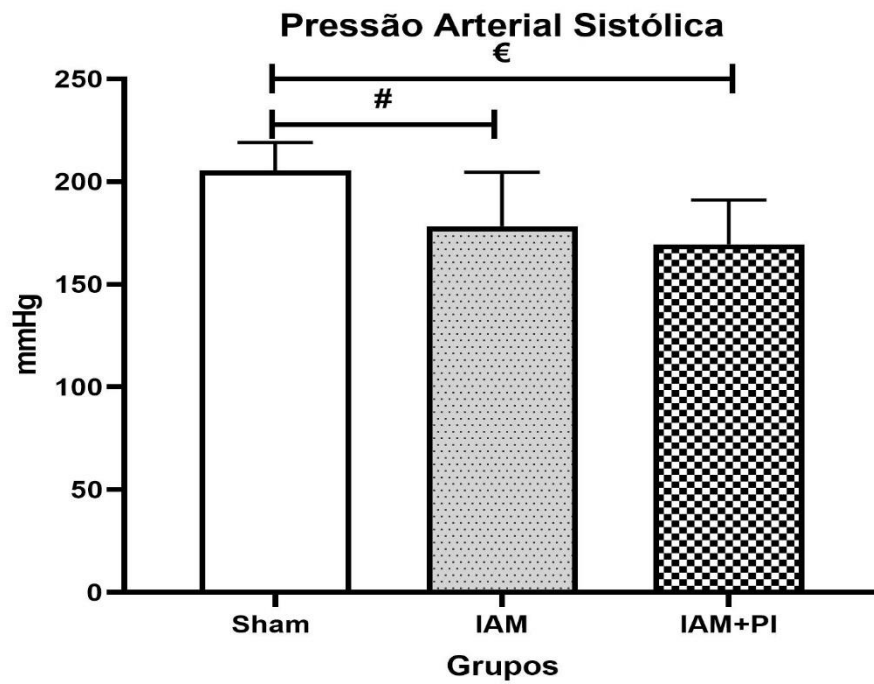


Figura 22 – Comparação das médias de pressão arterial sistólica (**PAS**) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.
 $\#p=0,032$ vs Sham; $\epsilon p=0,002$ vs Sham.

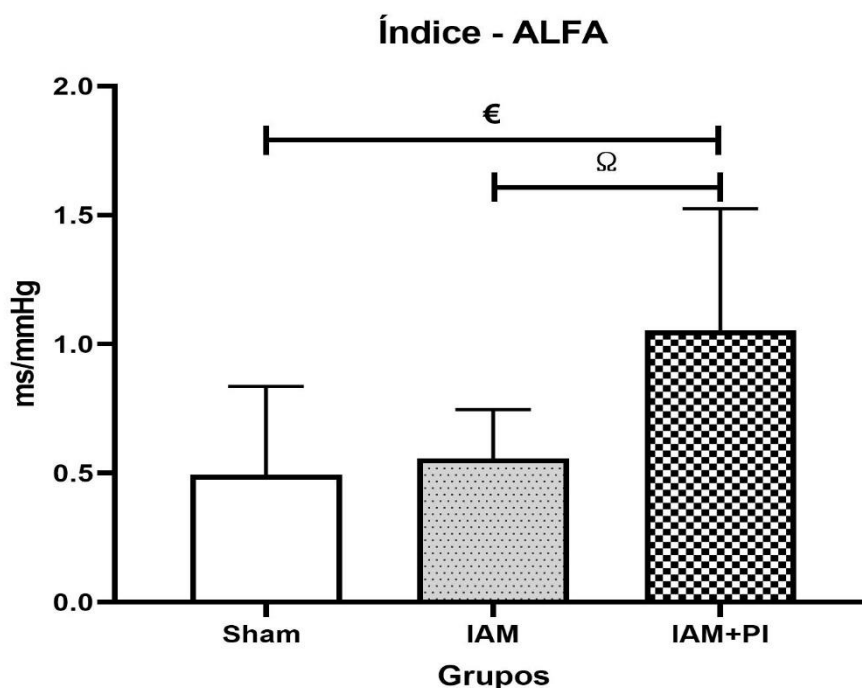


Figura 23 – Comparação das médias de **índice ALFA** entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

€ $p=0,007$ vs Sham; Ω $p=0,026$ vs Sham.

A avaliação ecocardiográfica (doppler) dos ratos SHR submetidos a cirurgia sham e infarto do miocárdio foi realizada no sexto dia de toracotomia, sob anestesia. Na tabela 4 estão os resultados das medidas dos parâmetros morfofuncionais cardíacos.

Nos ratos infartados sem tratamento, os diâmetros, os volumes e as áreas do ventrículo esquerdo (VE) mostraram valores aumentados tanto na fase sistólica quanto na fase diastólica, indicando um comprometimento morfofuncional do VE pelo infarto (Figuras 24 a 29). IAM vs Sham: Diâm.VES: $p=0,001$; Diâm.VED: $p=0,004$; Vol.VES: $p=0,001$; Vol.VED: $p=0,003$; Área VES: $p=0,001$; Área VED: $p=0,021$. Quando comparados aos ratos infartados sem tratamento, os ratos infartados tratados exibiram uma redução nos valores dos diâmetros, dos volumes e das áreas, tanto na fase sistólica quanto na diastólica (Figuras 24 a 29). IAM+PI vs IAM: Diâm.VES: $p=0,013$; Diâm.VED: $p=0,001$; Vol.VES: $p=0,01$; Vol.VED:

$p=0,001$; Área VES: $p=0,018$; Área VED: $p=0,003$, valores que podem indicar um efeito da piridostigmina sobre o remodelamento ventricular.

Com relação ao volume sistólico (VS), houve uma redução estatisticamente significativa no grupo IAM+PI vs Sham ($p=0,006$) e IAM+PI vs IAM ($p=0,048$), mostrando um comprometimento desta função sistólica nos ratos infartados, sem compensação pela piridostigmina (Figura 30). No débito cardíaco, uma variável dependente do volume sistólico, também houve uma queda no rato infartado quando comparado ao rato Sham (IAM vs Sham $p=0,012$), também não compensado pela piridostigmina, de modo significativo (Figura 31). Os grupos infartados tiveram redução significativa da função sistólica mensurada pela fração de ejeção do VE (FEVE) (IAM vs Sham $p=0,002$; IAM+PI vs Sham $p=0,03$) (Figura 32). No entanto, a função sistólica do VE, que mostrou uma queda quando medida pela Variação Fracional da Área (VE FAC) (IAM vs Sham $p=0,001$), foi significativamente atenuada no grupo tratado (IAM+PI vs IAM $p=0,04$) (Figura 33). A avaliação da função diastólica mostrou que o grupo infartado sem tratamento, comparado ao grupo Sham, teve um aumento significativo na razão E/A (onda de enchimento precoce/onda de contração atrial tardia); no entanto, ratos tratados com piridostigmina apresentaram uma redução significativa na razão E/A quando comparados aos ratos infartados sem tratamento (IAM+PI vs IAM $p=0,017$) (Figura 34).

Tabela 4. Comparação das médias dos parâmetros ecocardiográficos avaliados entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI

	Sham (n=15)	IAM (n=16)	IAM+PI (n=17)	p entre grupos
Diâm. AE (mm)	4,1 ± 0,9	4,4 ± 1,0	3,9 ± 0,6	0,305
Razão AO/AE (mm)	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,331
Diâm. VES (mm²)	5,6 ± 0,8	7,2 ± 1,3 [#]	6,0 ± 1,2 ^Ω	0,001*
Diâm. VED (mm²)	7,6 ± 0,6	8,6 ± 0,9 [#]	7,4 ± 1,0 ^Ω	0,001*
Vol. VES (cm³)	158,9 ± 49,9	283,0 ± 110,2 [#]	191,8 ± 81,2 ^Ω	0,001*
Vol. VED (cm³)	305,4 ± 53,9	407,5 ± 94,5 [#]	292,8 ± 88,0 ^Ω	0,001*
Área VES (mm²)	28,3 ± 9,3	44,2 ± 11,3 [#]	32,7 ± 12,9 ^Ω	0,001*
Área VED (mm²)	49,4 ± 9,4	60,1 ± 11,1 [#]	46,7 ± 11,1 ^Ω	0,002*
Massa VE (g/Kg)	476,9 ± 70,3	524,9 ± 143,5	475,3 ± 171,9	0,515
FC (bpm)	353,8 ± 28,4	368,9 ± 27,7	357,8 ± 44,4	0,459
VS (ml)	198,3 ± 52,3	177,9 ± 80,4	116,0 ± 49,7 ^{€Ω}	0,006*
DC (ml/min)	79,1 ± 17,5	40,3 ± 8,7 [#]	66,4 ± 23,0	0,012*
FEVE (%)	49,0 ± 9,8	32,1 ± 17,2 [#]	36,5 ± 11,1 [€]	0,002*
FAC VE (%)	43,8 ± 8,6	27,2 ± 9,0 [#]	35,9 ± 9,8 ^Ω	0,001*
Razão E/A	1,5 ± 0,4	2,3 ± 1,0 [#]	1,6 ± 0,3 ^Ω	0,006*
Razão E'/A'	0,9 ± 0,5	1,0 ± 0,4	1,1 ± 0,6	0,413
TRIV (ms)	17,8 ± 4,5	18,3 ± 4,6	20,0 ± 5,2	0,397
E/TRIV	814,1 ± 139,7	911,1 ± 142,7	761,0 ± 253,3	0,242

*p<0,05 (ANOVA): estatisticamente significante. AE: diâmetro atrial esquerdo; AO/AE: razão aorta/diâmetro atrial; Diâm.VES e Diâm VED: diâmetro ventricular esquerdo sistólico e diastólico, respectivamente; Vol.VES e Vol.VED: volume sistólico ventricular esquerdo e volume diastólico ventricular esquerdo, respectivamente; Área VES e Área VED: área sistólica ventricular esquerda e área diastólica ventricular esquerda, respectivamente. VE massa: massa ventricular esquerda; FC: frequência cardíaca; VS: volume sistólico; DC: débito cardíaco; FEVE: fração de ejeção ventricular esquerda; FAC VE: função sistólica global ventricular esquerda estimada pela FAC; FAC: variação fracional da área; E: onda do enchimento precoce; A: onda do enchimento tardio; E/A: fluxo transmitral/razão E/A da função diastólica; E' e A': velocidades das ondas E' e A' no doppler tecidual; E'/A': razão E'/A' da função diastólica; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; E/TRIV: razão E/tempo de relaxamento isovolumétrico.

[#]p<0,05 IAM vs Sham; [€]p<0,05 IAM+PI vs Sham; ^Ωp<0,05 IAM+PI vs IAM

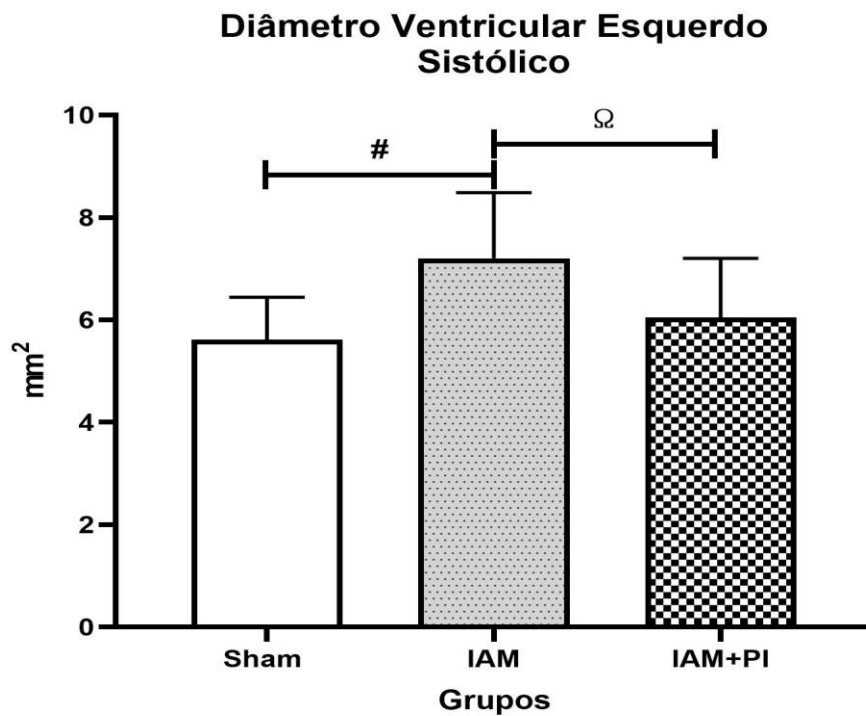


Figura 24: Comparação das médias do diâmetro ventricular esquerdo sistólico (Diâm. VES) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.
[#] $p=0,001$ vs Sham; ^Ω $p=0,013$ vs IAM.

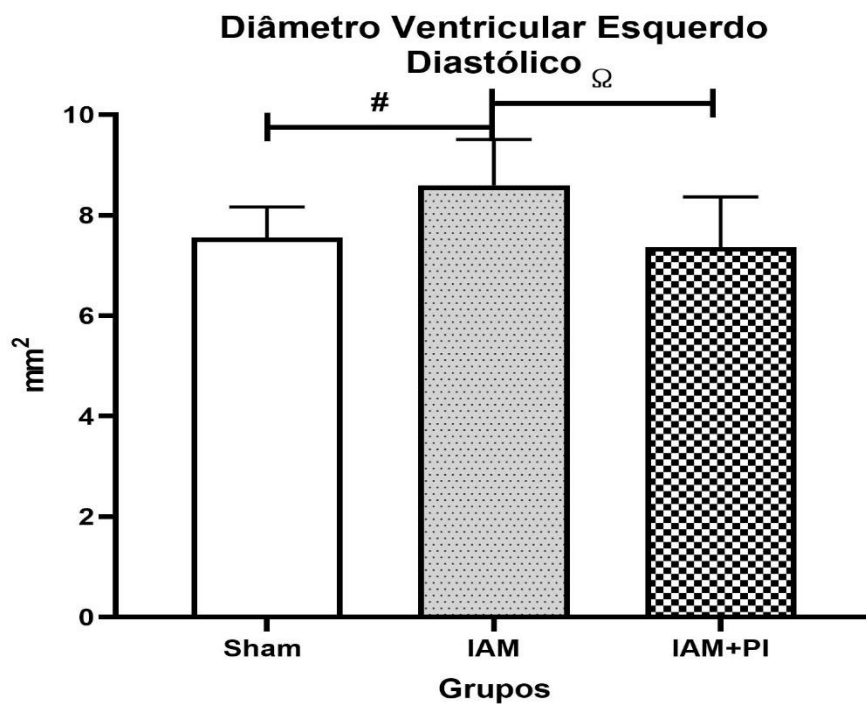


Figura 25: Comparação das médias do diâmetro ventricular esquerdo diastólico (Diâm. VED) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.
[#] $p=0,004$ vs Sham; ^Ω $p=0,001$ vs IAM.

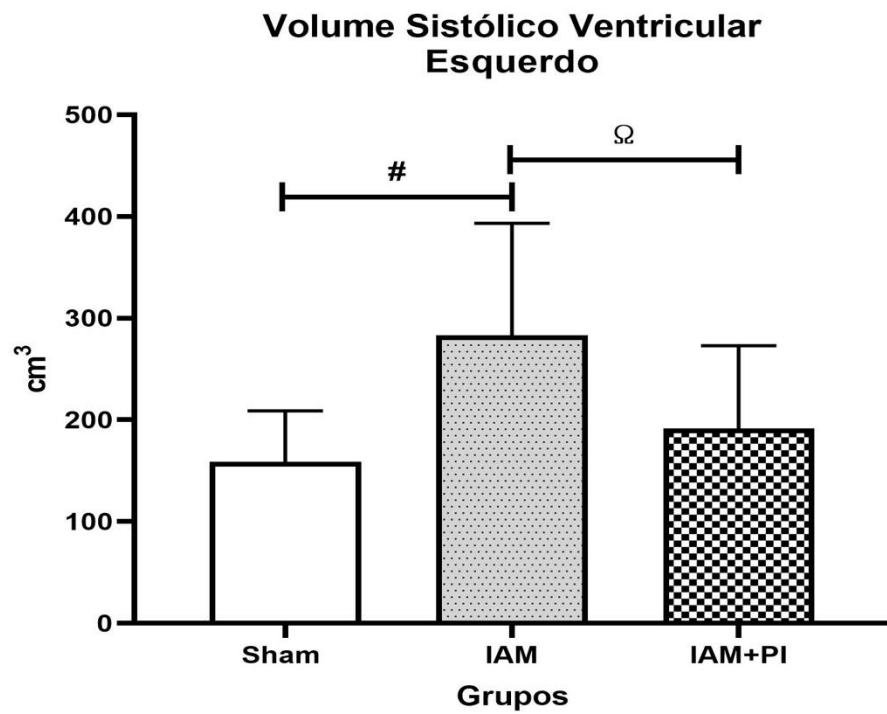


Figura 26 – Comparação das médias do Volume Sistólico Ventricular Esquerdo (Vol. SVE) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.
[#] $p=0,001$ vs Sham; ^Ω $p=0,010$ vs IAM.

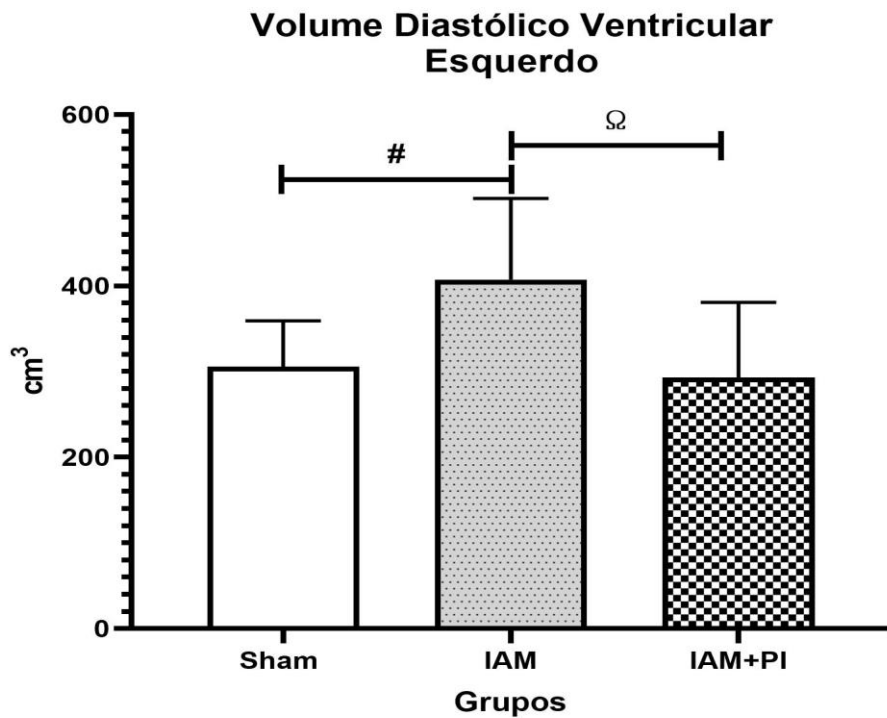


Figura 27 – Comparação das médias do volume diastólico ventricular esquerdo (Vol. DVE) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.
[#] $p=0,003$ vs Sham; ^Ω $p=0,001$ vs IAM.

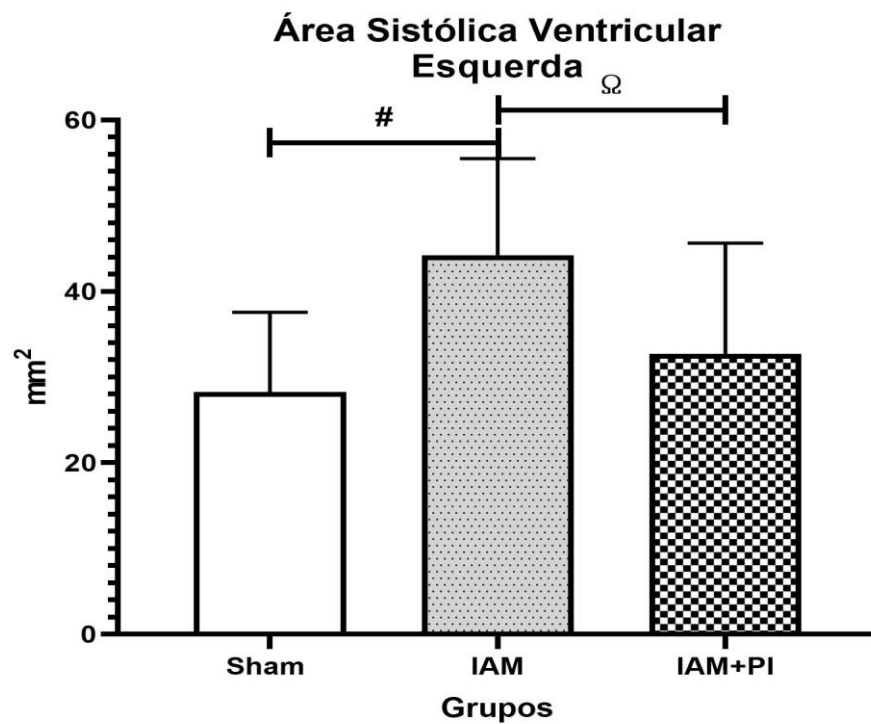


Figura 28 – Comparação das médias da área sistólica ventricular esquerda (**Área SVE**) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.
 $^{\#}p=0,001$ vs Sham; $^{\Omega}p=0,018$ vs IAM.

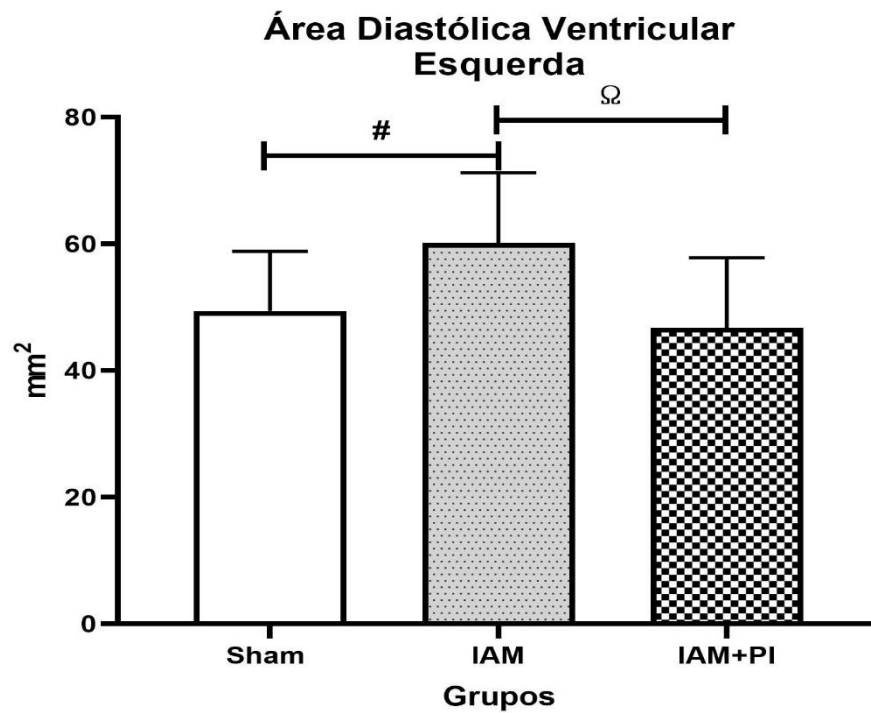


Figura 29 - Comparação das médias da área diastólica ventricular esquerda (**Área DVE**) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.
 $^{\#}p=0,021$ vs Sham; $^{\Omega}p=0,003$ vs IAM.

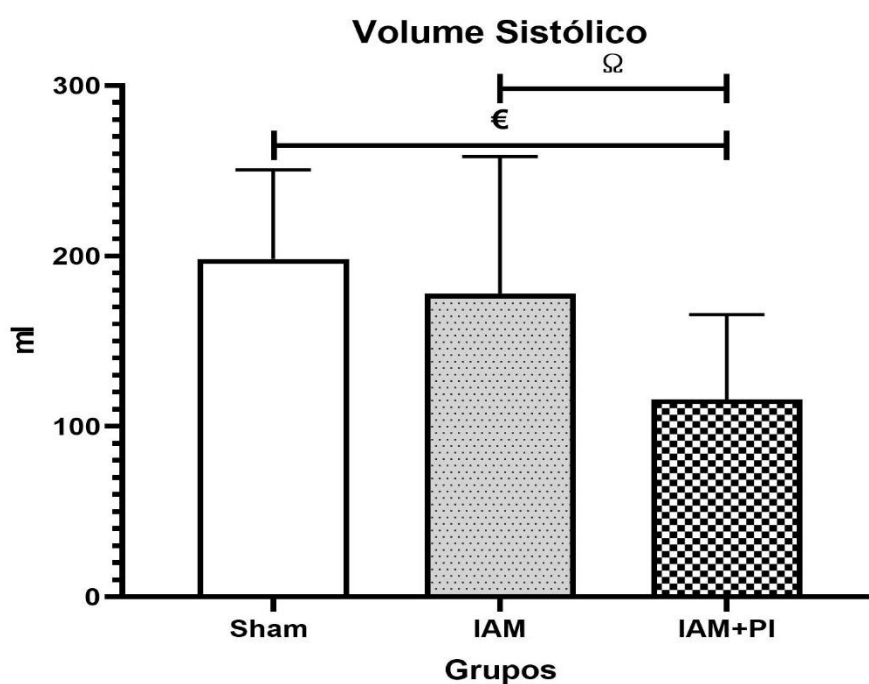


Figura 30 – Comparação das médias do volume sistólico (**VS**) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.
 $\epsilon p=0,006$ vs Sham; $\Omega p=0,048$ vs IAM.

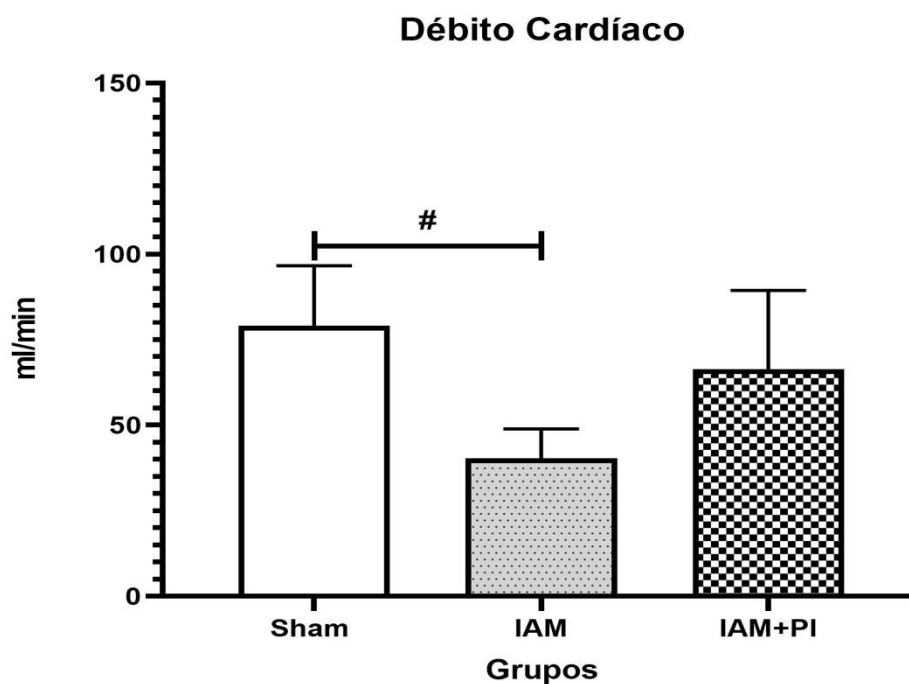


Figura 31 – Comparação das médias de débito cardíaco (**DC**) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.
 $\# p=0,012$ vs Sham.

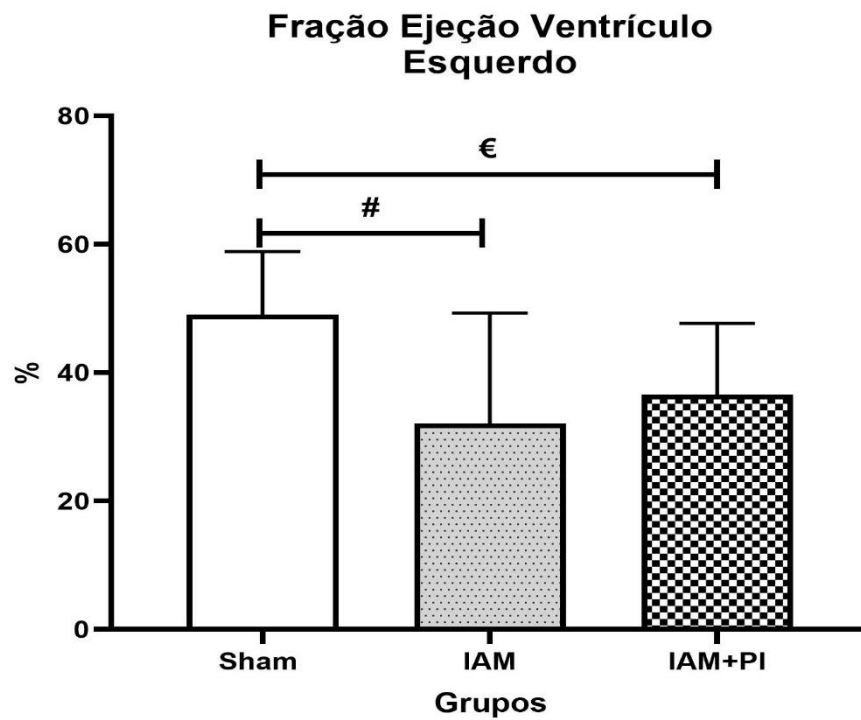


Figura 32 – Comparação das médias de fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.
$p=0,002$ vs Sham; € $p=0,030$ vs Sham.

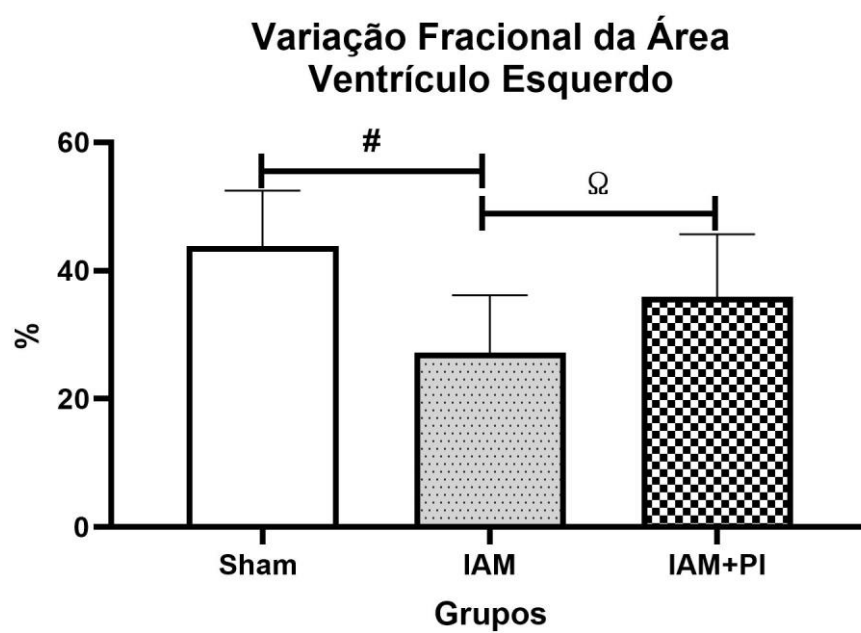


Figura 33 – Comparação das médias da variação fracional da área (**FAC**) do ventrículo esquerdo entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.
 $\#p=0,001$ vs Sham; $\Omega p=0,040$ vs IAM.

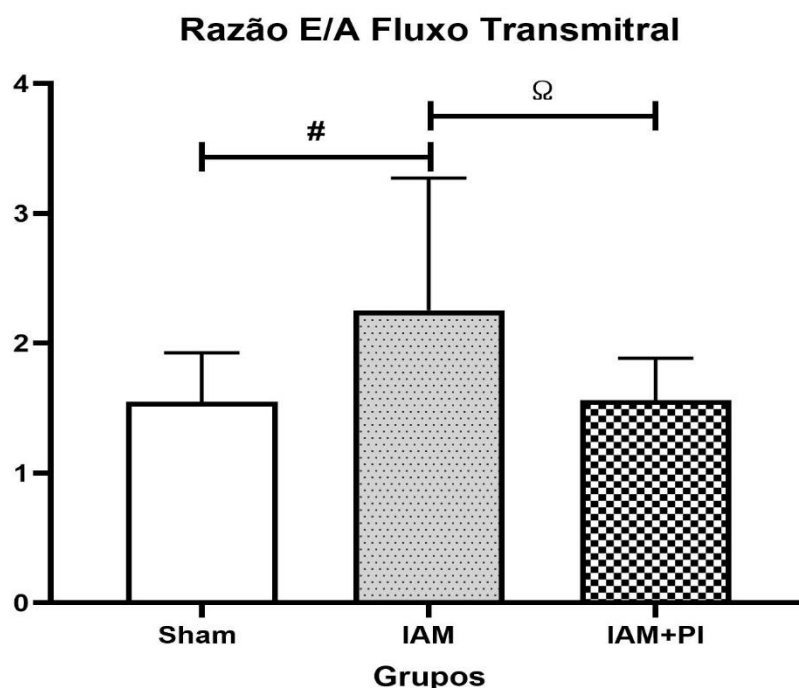


Figura 34 – Comparação das médias da **razão E/A** Fluxo Transmitral entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.
 $\#p=0,015$ vs Sham; $\Omega p=0,017$ vs IAM.

Os resultados das tomografias por emissão de pósitrons do coração e do cérebro (PET do coração e PET cerebral) são mostrados nas tabelas a seguir. A Tabela 5 mostra os valores quantitativos no PET (^{18}F -FDG) do coração realizados nos 3 grupos de ratos SHR (Sham, IAM e IAM+PI). Como pode ser observado, não há diferenças nos níveis de captação entre os grupos avaliados (Sham, IAM e IAM+PI). No entanto, podemos chamar atenção para a redução nos valores das médias em LAD no grupo IAM e no grupo IAM+PI em relação ao grupo Sham, mesmo não havendo diferença estatística.

Tabela 5. Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco ^{18}F -FDG avaliados no PET scan cardíaco entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

	Sham (n=7)	IAM (n=4)	IAM+PI (n=7)	p entre grupos
LAD	3,3 ± 0,7	3,0 ± 0,9	2,7 ± 0,6	0,373
RCA	3,1 ± 0,7	3,7 ± 1,2	3,0 ± 0,7	0,356
LCX	3,4 ± 0,8	3,2 ± 1,0	2,8 ± 0,7	0,370
GLOBAL	3,3 ± 0,7	3,3 ± 1,0	2,8 ± 0,6	0,462
TOTAL	3,4 ± 0,8	3,3 ± 1,0	2,9 ± 0,6	0,451

LAD: artéria descendente anterior; RCA: artéria coronária direita; LCX: artéria circunflexa; mid: segmento mediano.

A Tabela 6 mostra os valores quantitativos dos SUVs obtidos no PET (18F-FDG) cerebral nos 3 grupos de ratos SHR (Sham, IAM e IAM+PI). Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos foram encontradas em 13 dos 17 SUVs cerebrais representados na tabela (de 84 SUVs originais avaliados pelo exame). A análise *post-hoc* revelou que estas diferenças aconteceram nos grupos infartados quando comparados ao grupo Sham (IAM vs Sham e IAM+PI vs Sham). Esses 13 SUVs que mostraram diferenças entre os grupos correspondem, no entanto, a apenas 9 regiões cerebrais no grupo IAM e a 5 regiões cerebrais no grupo IAM+PI (ou por causa de apenas um dos lados (Esquerdo, Direito) mostrarem a diferença ou por causa dos valores das médias D + E; por exemplo: Hipotálamo D, Hipotálamo E, Hipotálamo med fornecem 3 SUVs de 2 regiões). Não foi observado nenhum resultado estatisticamente significativo da piridostigmina entre os grupos IAM+PI vs IAM. As 9 áreas que mostraram redução na captação nos ratos infartados foram: cérebro global, Núcleo accumbens E, Núcleo accumbens D, Hipotálamo E, Hipotálamo D, Bulbo, Amígdala E, Cortex entorrinal E, e Cortex olfatório E. As 3 últimas áreas indicam uma assimetria de captação nas mesmas. As 5 áreas que mostraram redução na captação nos ratos tratados foram: cérebro global, Núcleo accumbens E, Hipotálamo E, Hipotálamo D e Bulbo.

Tabela 6. Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco ^{18}F -FDG avaliados no PET scan de regiões cerebrais entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

SUV (média)	Sham (n=5)	IAM (n=6)	IAM+PI (n=8)	p entre grupos
Cérebro (global)	2,21 ± 0,7	1,35 ± 0,2 [#]	1,45 ± 0,1 [€]	0,002*
N accumbens E	2,57 ± 0,9	1,46 ± 0,3 [#]	1,68 ± 0,1 [€]	0,017*
N accumbens D	2,28 ± 0,8	1,53 ± 0,4 [#]	1,65 ± 0,2	0,039*
N accumbens med	2,45 ± 0,7	1,53 ± 0,4 [#]	1,67 ± 0,1 [€]	0,002*
Hipotálamo E	1,90 ± 0,7	1,17 ± 0,2 [#]	1,28 ± 0,1 [€]	0,014*
Hipotálamo D	2,04 ± 0,6	1,19 ± 0,3 [#]	1,29 ± 0,2 [€]	0,002*
Hipotálamo med	2,2 ± 0,6	1,20 ± 0,3 [#]	1,28 ± 0,1 [€]	0,002*
Bulbo	2,02 ± 0,7	1,16 ± 0,3 [#]	1,12 ± 0,2 [€]	0,002*
Amígdala E	1,49 ± 0,4	1,08 ± 0,2 [#]	1,19 ± 0,1	0,032*
Amígdala D	1,27 ± 0,4	1,15 ± 0,2	1,24 ± 0,1	0,717
Amígdala med	1,47 ± 0,4	1,12 ± 0,2	1,22 ± 0,1	0,055
Cortex entorrinal E	1,65 ± 0,4	1,21 ± 0,2 [#]	1,35 ± 0,2	0,040*
Cortex entorrinal D	1,62 ± 0,4	1,26 ± 0,2	1,38 ± 0,1	0,063
Cortex entorrinal med	1,63 ± 0,4	1,23 ± 0,2 [#]	1,36 ± 0,1	0,046*
Olfatório E	1,83 ± 0,4	1,31 ± 0,2 [#]	1,60 ± 0,1	0,011*
Olfatório D	1,71 ± 0,4	1,36 ± 0,2	1,52 ± 0,1	0,083
Olfatório med	1,77 ± 0,3	1,33 ± 0,2 [#]	1,56 ± 0,1	0,016*

***P<0,05** (ANOVA): Estatisticamente significativa. E: esquerdo; D: direito; med: média; N: Núcleo.

[#]*p*<0,05 IAM vs Sham; [€] *p*<0,05 IAM+PI vs Sham

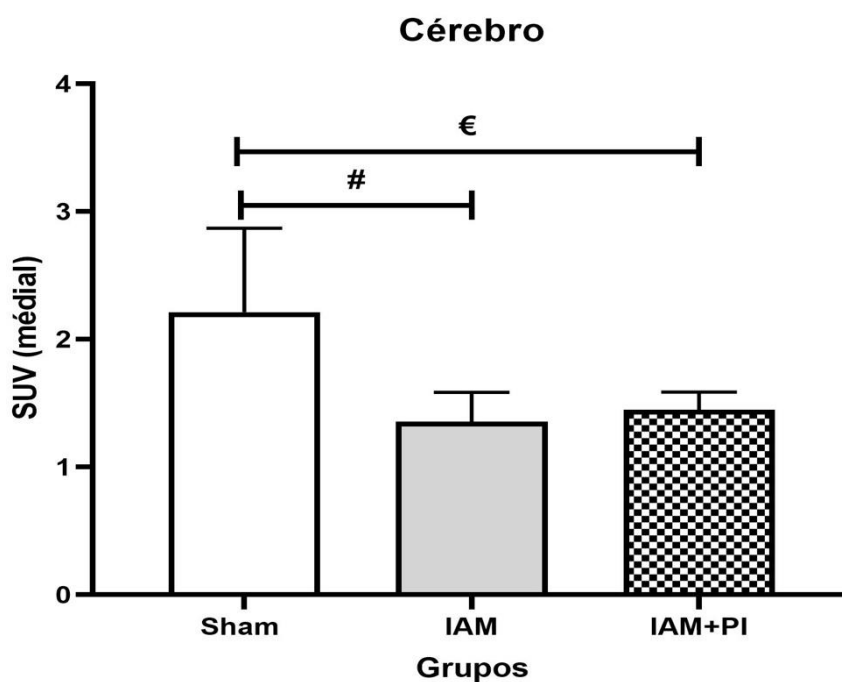


Figura 35 – Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco ^{18}F -FDG do tecido cerebral total entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

$p=0,003$ vs Sham; € $p=0,006$ vs Sham.

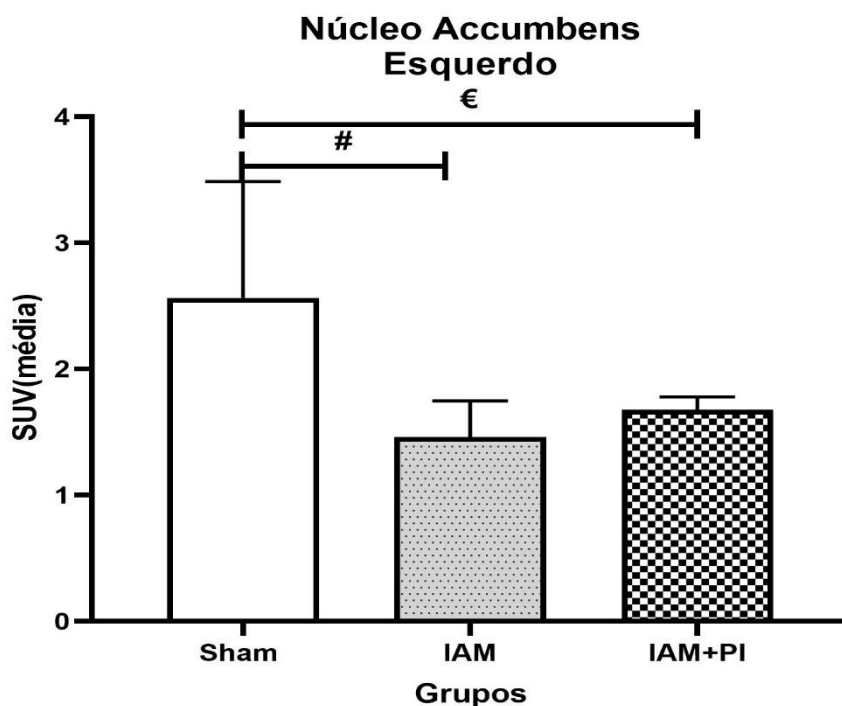


Figura 36 – Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco ^{18}F -FDG do **núcleo accumbens esquerdo** entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

$p=0,005$ vs Sham; € $p=0,016$ vs Sham.

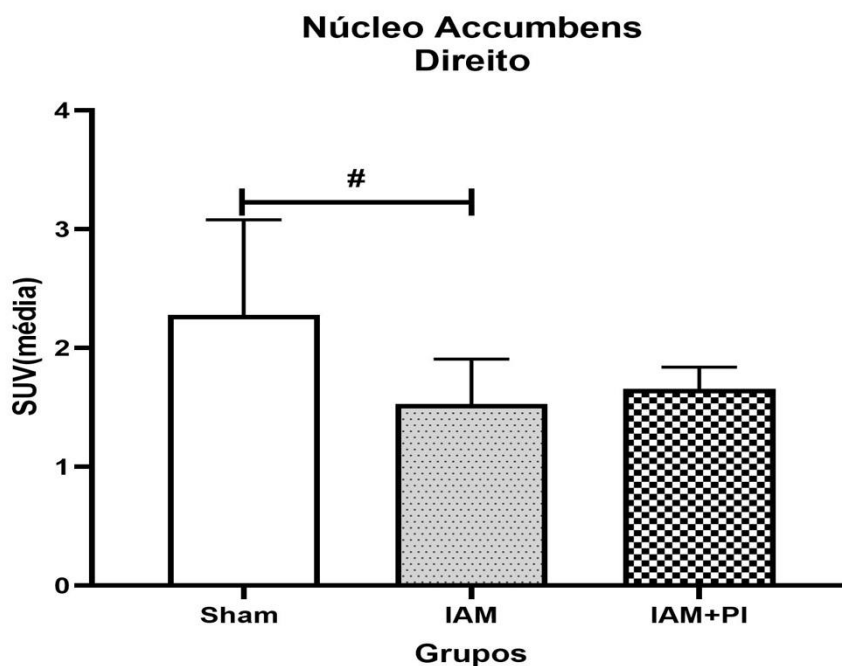


Figura 37 - Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco ^{18}F -FDG do **núcleo accumbens direito** entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI. $\#p= 0,050$ vs Sham.

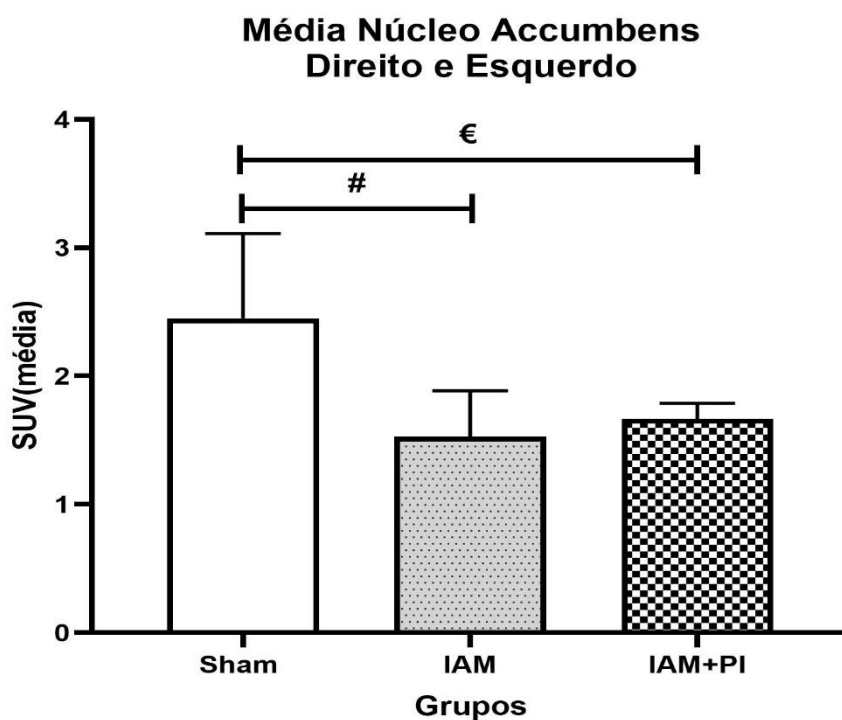


Figura 38 - Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco ^{18}F -FDG da **média do núcleo accumbens direito e esquerdo** entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

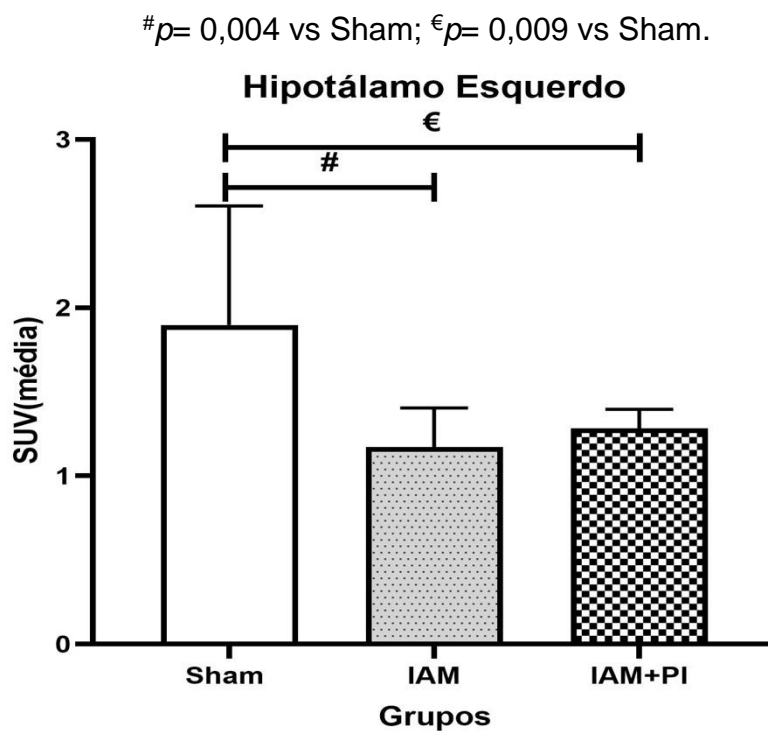


Figura 39 - Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco ^{18}F -FDG do **hipotálamo esquerdo** entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.
$p=0,019$ vs Sham; € $p=0,038$ vs Sham.

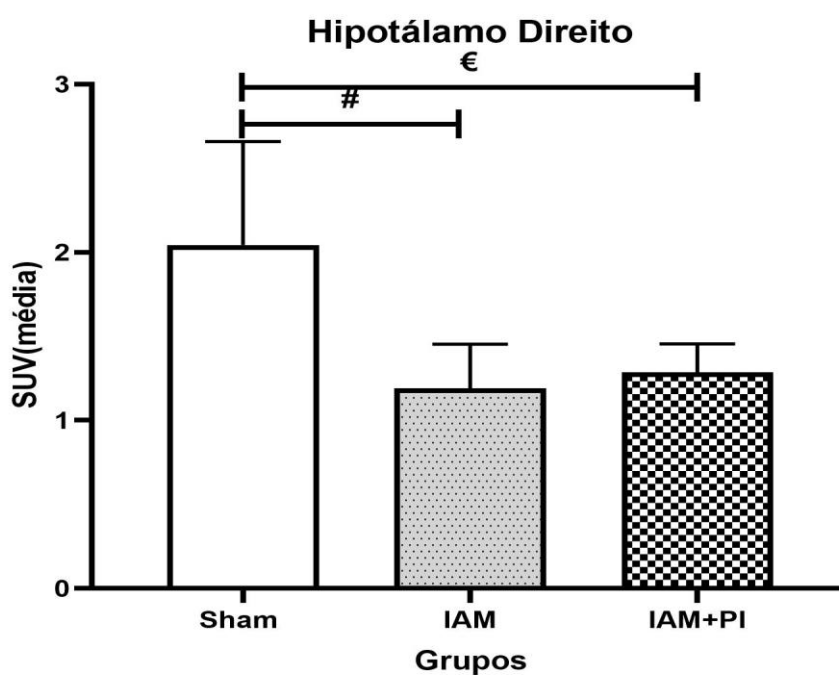


Figura 40 - Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco ^{18}F -FDG do **hipotálamo direito** entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.
$p=0,003$ vs Sham; € $p=0,005$ vs Sham.

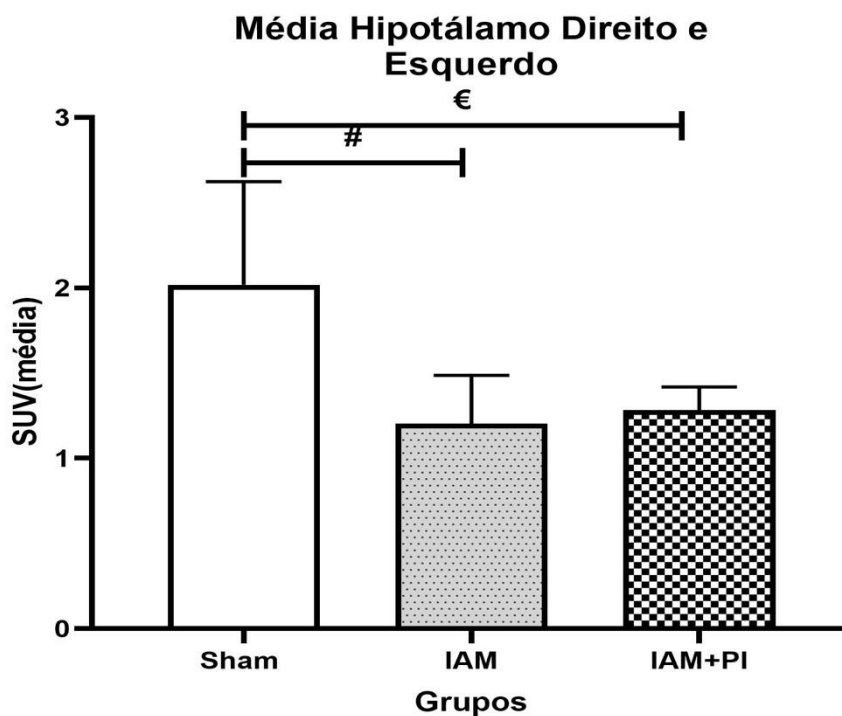


Figura 41 - Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco ^{18}F -FDG da **média do hipotálamo direito e esquerdo** entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI. # $p= 0,004$ vs Sham; € $p= 0,006$ vs Sham.

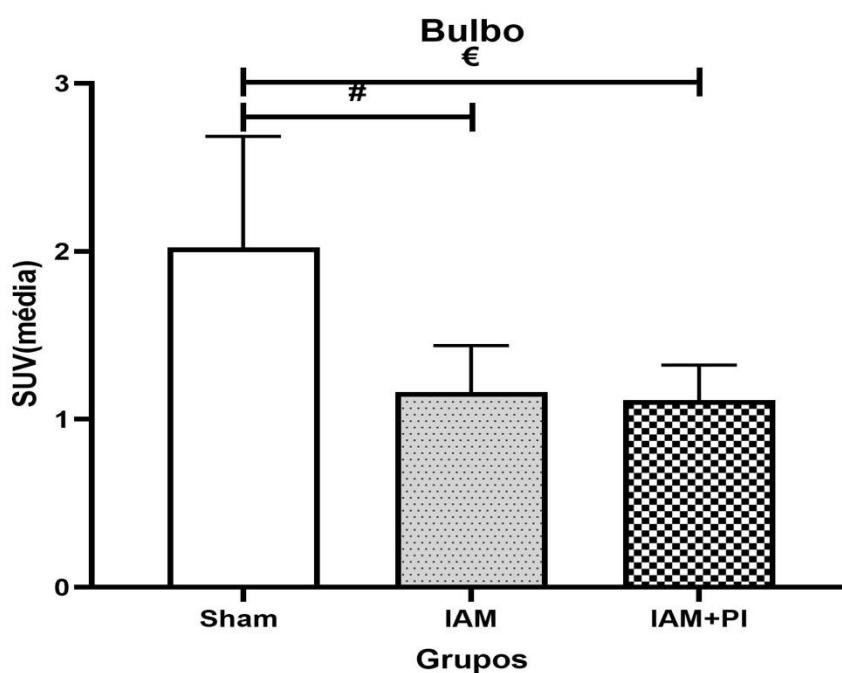


Figura 42 - Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco ^{18}F -FDG do **bulbo** entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI. # $p= 0,007$ vs Sham; € $p= 0,003$ vs Sham.

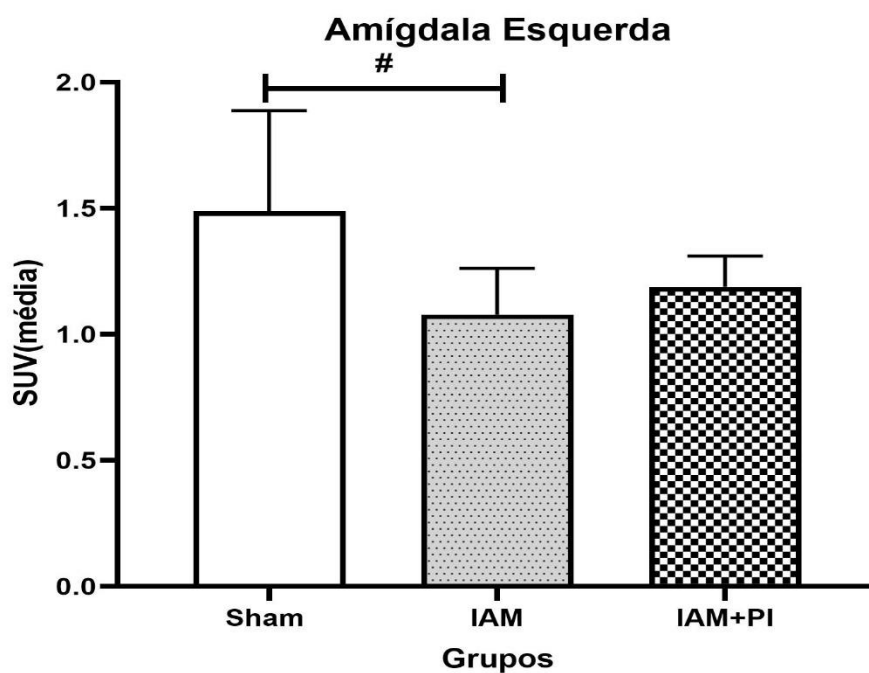


Figura 43 - Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco ^{18}F -FDG da **amígdala esquerda** entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI. # $p=0,035$ vs Sham.

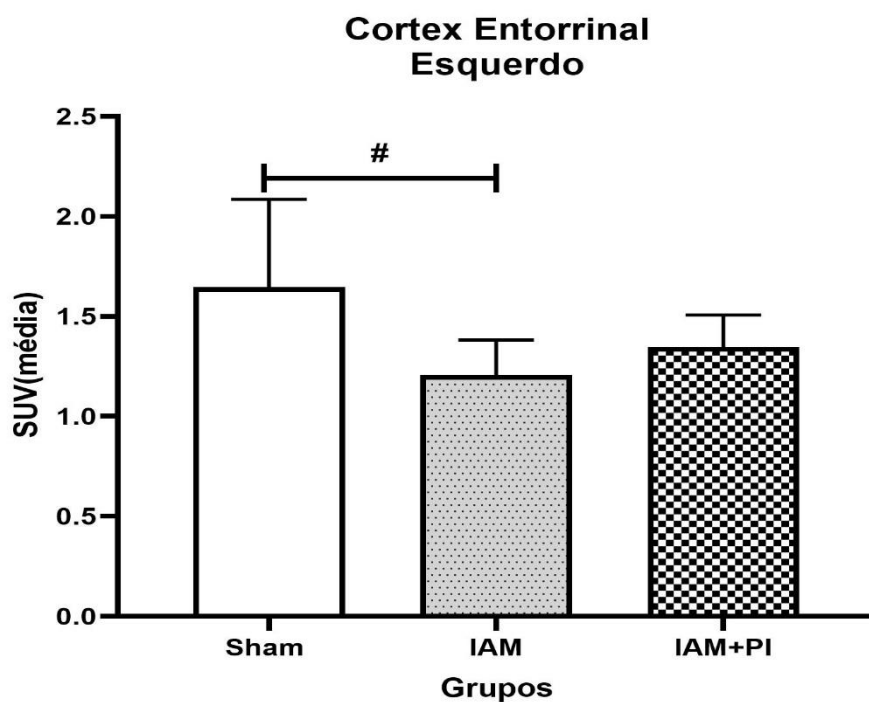


Figura 44 - Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco ^{18}F -FDG do **córtex entorrinal esquerdo** entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI. # $p=0,041$ vs Sham.

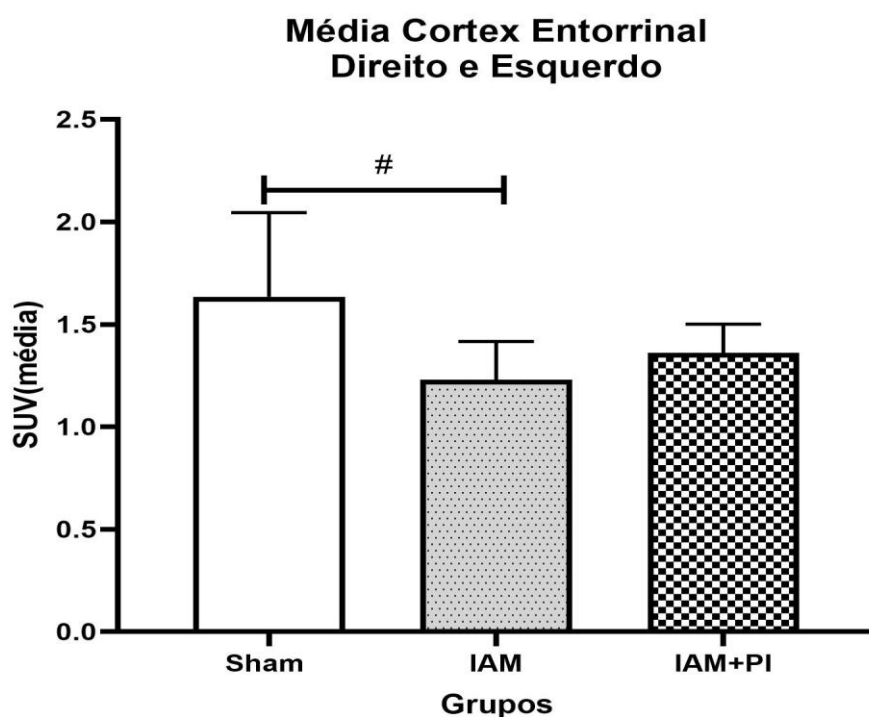


Figura 45 - Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco ^{18}F -FDG da **média do córtex entorrinal direito e esquerdo** entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI. $\#p=0,047$ vs Sham.

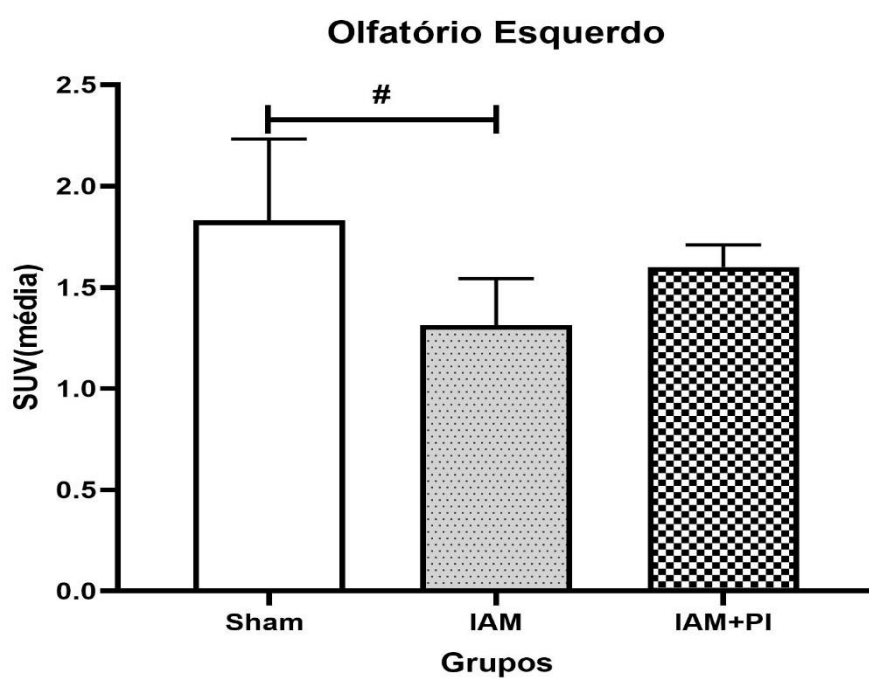


Figura 46 - Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco ^{18}F -FDG do **olfatório esquerdo** entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI. $\#p=0,010$ vs Sham.

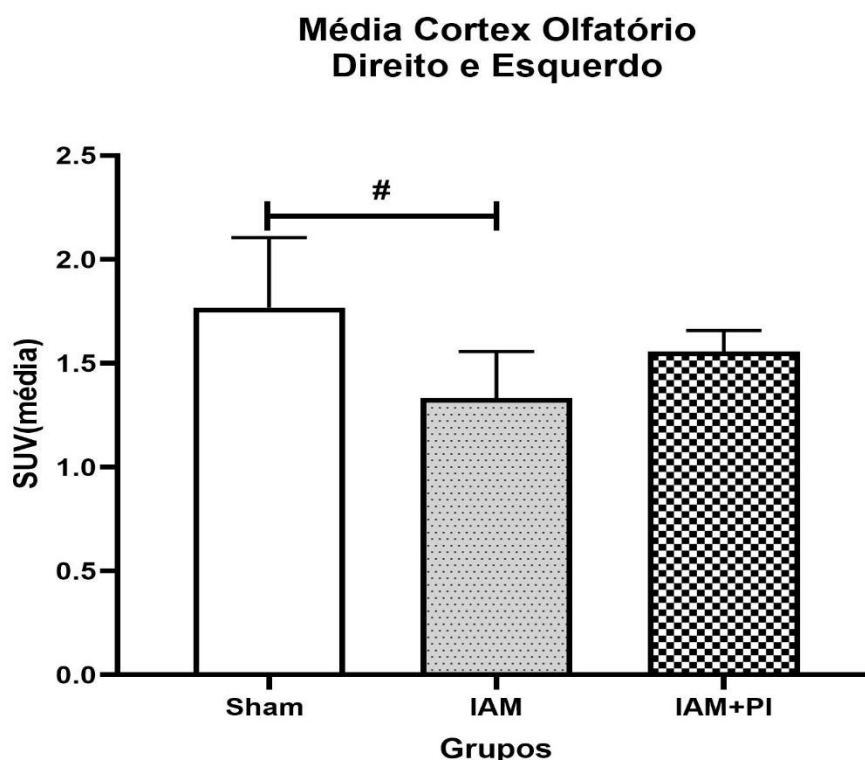


Figura 47 - Comparação das médias dos valores padronizados de captação (SUV) de radiofármaco ^{18}F -FDG da média do Cortex Olfatório Direito e Esquerdo entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI. $\#p=0,014$ vs Sham.

A Tabela 7 mostra valores da expressão gênica de mRNA de citocinas do miocárdio (VE) no sétimo dia de infarto, após a eutanásia. Diferenças estatisticamente significantes entre os grupos foram observadas em quatro citocinas: IL-6, IL-10, IL-17A e TNF- α . Os valores de IL-6 (pró-inflamatória), IL-10 (anti-inflamatória), IL-17A (pró-inflamatória) e TNF- α (pró-inflamatória) estiveram elevados no grupo infartado tratado tanto em relação ao grupo Sham quanto em relação ao grupo sem tratamento (IAM+PI vs Sham e IAM+PI vs IAM), indicando um efeito biológico do infarto e/ou da piridostigmina sobre a expressão gênica. As citocinas IL-1 β (pró-inflamatória) e IL-13 (anti-inflamatória) não apresentaram

diferenças entre os grupos, e a MCP-1, uma quimiocina reguladora da migração e infiltração de monócitos/macrófagos, também não apresentou diferenças entre os grupos.

Tabela 7. Comparação das médias de expressão gênica miocárdica de citocinas entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI.

	Sham (n=5)	IAM (n=5)	IAM+PI (n=5)	p entre grupos
<i>IL-1β</i>	0,76 \pm 0,29	2,46 \pm 1,27	6,37 \pm 5,19	0,058
<i>IL-6</i>	0,77 \pm 0,51	1,88 \pm 0,73	4,48 \pm 2,95 $^{\epsilon\Omega}$	0,030*
<i>IL-10</i>	0,84 \pm 0,83	5,53 \pm 2,33	25,50 \pm 21,81 $^{\epsilon\Omega}$	0,034*
<i>IL-13</i>	1,42 \pm 1,74	7,03 \pm 4,23	14,85 \pm 13,64	0,116
<i>IL-17A</i>	0,50 \pm 0,46	22,90 \pm 11,64	107,59 \pm 73,90 $^{\epsilon\Omega}$	0,018*
<i>TNF- α</i>	0,24 \pm 0,16	11,98 \pm 10,25	69,95 \pm 45,46 $^{\epsilon\Omega}$	0,040*
<i>MCP-1</i>	0,78 \pm 0,32	0,86 \pm 0,16	1,93 \pm 1,88	0,258

***P<0,05**(ANOVA One-way): Estatisticamente significativa. IAM: Infarto agudo miocárdio; PI: Piridostigmina; IL: interleucina; MCP1: Proteína 1 quimioatrativa de monócitos; TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa.

$^{\epsilon}$ $p<0,05$ IAM+PI vs Sham; $^{\Omega}$ $p<0,05$ IAM+PI vs IAM

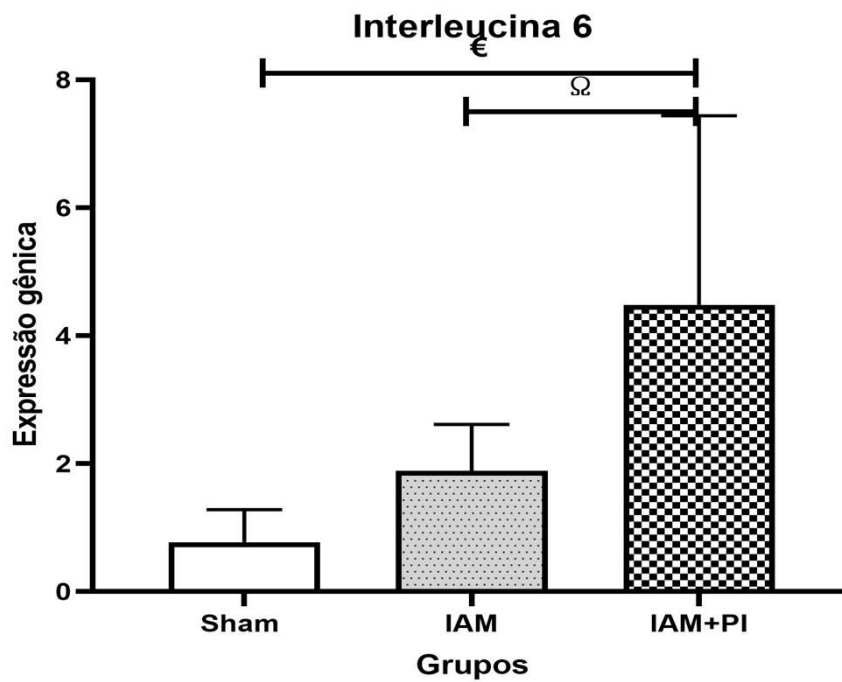


Figura 48. Comparação das médias de expressão gênica miocárdica de interleucina 6 entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI. $^{\epsilon}p= 0,011$ vs Sham; $^{\Omega}p=0,046$ vs IAM

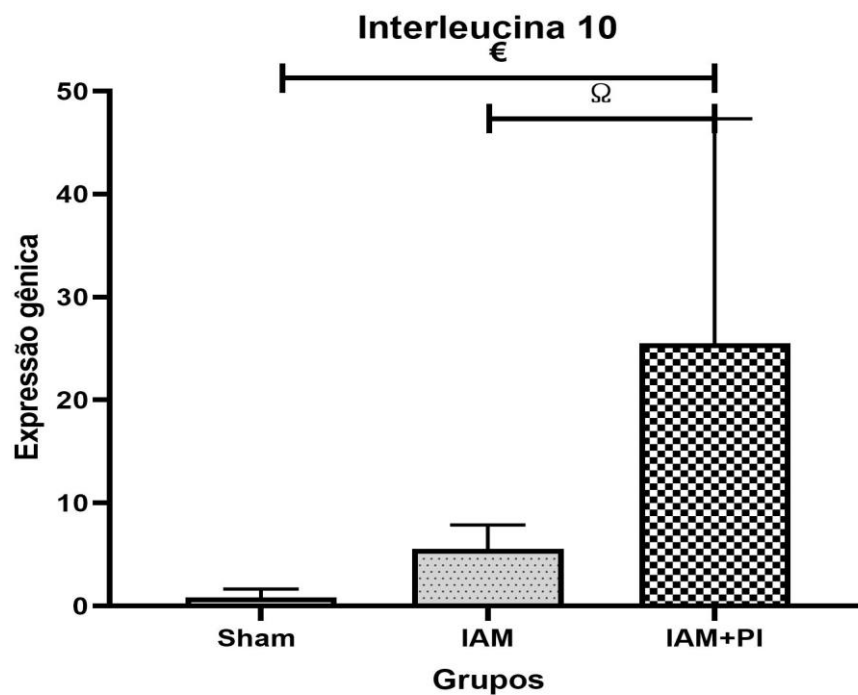


Figura 49. Comparação das médias de expressão gênica miocárdica de interleucina 10 entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI. $^{\epsilon}p= 0,011$ vs Sham; $^{\Omega}p=0,046$ vs IAM

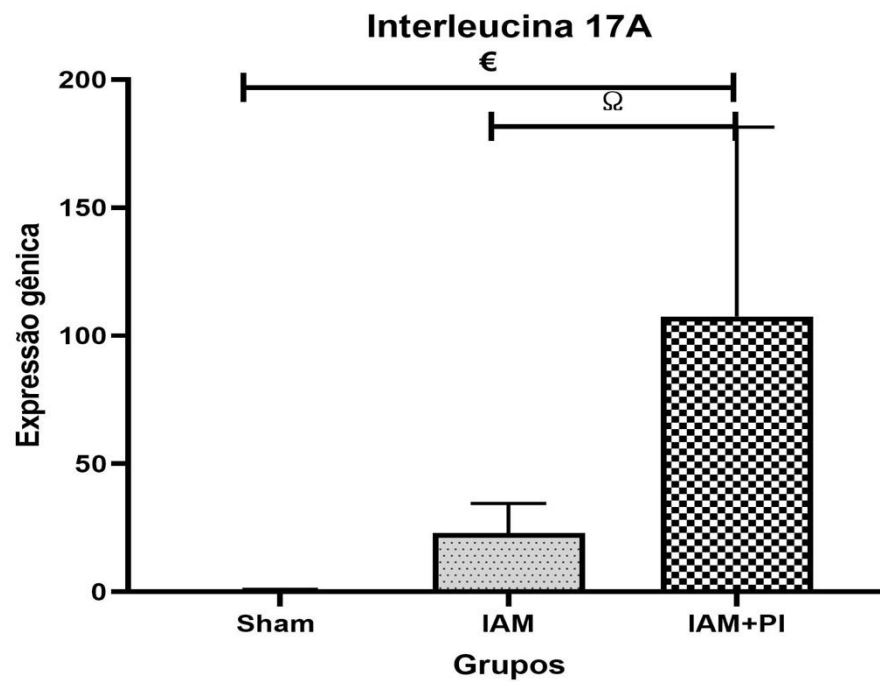


Figura 50. Comparação das médias de expressão gênica miocárdica de interleucina 17A entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI. $^{\epsilon}p=0,011$ vs Sham; $^{\Omega}p=0,046$ vs IAM

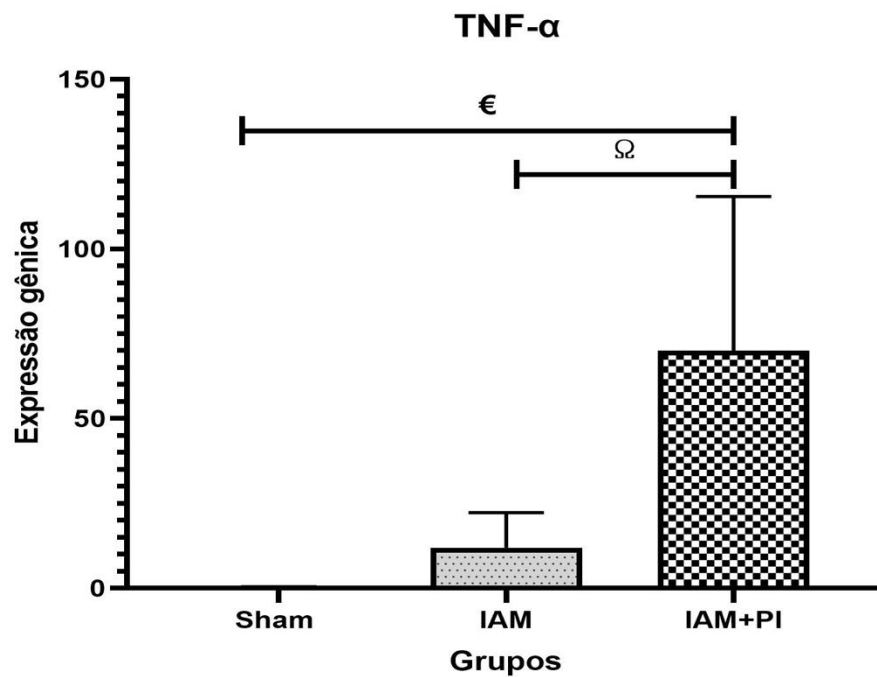


Figura 51. Comparação das médias de expressão gênica miocárdica de TNF- α entre os grupos Sham, IAM e IAM+PI. $^{\epsilon}p=0,011$ vs Sham; $^{\Omega}p=0,046$ vs IAM

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou se a administração oral de piridostigmina, atuando sobre variáveis hemodinâmicas, autonômicas e inflamatórias em SHRs com indução de IAM, restaura parâmetros cardíacos morfofuncionais, otimizando, por sua vez, o metabolismo energético de glicose miocárdica e cerebral.

Os achados mais impactantes mostrados por esse estudo são uma assimetria no metabolismo de áreas cerebrais poucos dias após o IAM, relacionadas ao sistema límbico, e portanto ao comportamento, integração de respostas autonômicas, hormonais e sono. O tratamento com 7 dias de piridostigmina não interferiu no metabolismo do SNC, porém causou significativa melhora em diversos parâmetros morfofuncionais do coração e um significativo aumento da expressão de mRNA de citocinas do ventrículo esquerdo, tanto com perfil pró- quanto anti-inflamatório.

No nosso estudo, a análise dos dados do PET ^{18}F -FDG (realizado no sétimo dia de infarto), mostrou uma redução na captação de glicose pelo cérebro global em ratos SHR infartados tratados e não tratados (7 dias de infarto) quando comparados a ratos Sham, indicando uma alteração no metabolismo cerebral secundário ao infarto do miocárdio. Num estudo avaliando a evolução dinâmica do metabolismo da glicose e da estrutura neuronal, publicado em janeiro de 2020, ratos Sprague-Dawley infartados com insuficiência cardíaca *aguda* (10 dias após o infarto) mostraram um decremento na captação de ^{18}F -FDG no mesencéfalo e na ponte. Ao mesmo tempo, os animais mostraram um incremento na captação no cortex pré-frontal, no cortex pré-frontal medial, no giro do cíngulo e nos gânglios da base, fato este que foi atribuído a mecanismos metabólicos compensatórios; no entanto, na fase *crônica* da insuficiência cardíaca (60 dias após o infarto), os ratos

mostraram declínio metabólico, alterações cognitivas e degeneração neuronal avaliada pela coloração de Nissl e pela microscopia eletrônica de transmissão (120). Em humanos, há estudos com PET ^{18}F -FDG que mostram uma redução significativa do metabolismo cerebral em pacientes com doença cardíaca isquêmica com ou sem insuficiência cardíaca (121,122). Normalmente, o cérebro tem a propriedade de regular seus vasos (autorregulação cerebral) independentemente das variações na Pressão Arterial Média (PAM) numa faixa de valores para cima e para baixo – em humanos, entre 60 e 150 mmHg-, o que mantém sua perfusão relativamente constante (123). Se a PAM fica abaixo ou acima dos valores normais (não existe um consenso sobre quais seriam esses valores), a autorregulação cerebral fica comprometida e a perfusão cerebral passa a depender diretamente da pressão arterial. Se a PAM começa a cair, ocorre uma vasodilatação arteriolar cerebral compensatória. Na hipertensão, no entanto, a curva de autorregulação sofre um deslocamento para níveis mais altos (pressão arterial alta) comprometendo a autorregulação e assim a perfusão cerebral (123,124). Há, portanto, uma relação entre a PAM e o fluxo sanguíneo cerebral.

No nosso estudo, os valores da PAM foram (média + DP) de $172 \pm 8,1$ (Sham), $149 \pm 17,8$ (IAM) e $142 \pm 11,6$ (IAM+PI), evidenciando uma queda estatisticamente significativa entre os 2 grupos infartados e o grupo Sham (IAM vs Sham e IAM+PI vs Sham). Portanto, uma queda na PAM que se distanciou dos níveis mais altos da curva de autorregulação cerebral, caindo para níveis abaixo da PAM “normal” do grupo Sham. Se formos calcular a diferença de valores entre o grupo infartado (IAM) e o grupo Sham (Sham), temos uma queda de 13,5% na PAM dos ratos infartados, e uma queda de 5,5% na dos ratos infartados tratados (IAM+PI) diante dos infartados (IAM) sem tratamento. Ocorre que não sabemos os limites inferiores

de PAM em ratos SHR que poderiam afetar a autorregulação cerebral nessa espécie animal. Decorre dessa observação, a ideia de que a queda na PAM pode ter tido influência sobre a redução na captação nos animais dos 2 grupos infartados. Os componentes pulsáteis da pressão arterial também são de importância, sendo objeto de estudo nos últimos anos (125,126,127). A onda de compressão direta (para a frente) [FCW, Forward Compression Wave], não avaliada em nosso estudo, é gerada a partir da contração do ventrículo esquerdo e é transmitida para a aorta e para os vasos cervicais e cefálicos. É a onda dominante na aorta e na carótida, sendo transmitida para os vasos pequenos do cérebro. Essa onda promove uma aceleração do sangue nos vasos, resultando em aumento da velocidade de fluxo e pressão durante a sístole (128). Pode-se assim levantar a hipótese de que, no nosso estudo, a transmissão dessa onda de compressão direta de alta velocidade esteja diminuída *vis-à-vis* a queda nos valores pressóricos; prejudicando o fluxo nos pequenos vasos cerebrais, causando um efeito redutor no metabolismo da glicose. Um efeito restaurador na captação global não foi observado com o uso da piridostigmina, apesar da melhora da disfunção sistólica e diastólica nos ratos infartados.

Ainda no nosso estudo, a captação da glicose mostrou-se significativamente diminuída em 9 regiões cerebrais dos ratos infartados (IAM) e em 5 áreas dos ratos infartados que receberam piridostigmina (IAM+PI). As 9 regiões cerebrais no grupo IAM foram: cérebro global, Nucleus accumbens E, Nucleus accumbens D, Hipotálamo E, Hipotálamo D, Bulbo, Amígdala E, Cortex entorrinal E e Olfatório E. As 5 regiões cerebrais no grupo IAM+PI que mostraram diminuição na captação da glicose foram: cérebro global, Núcleo Accumbens E, Hipotálamo E, Hipotálamo D e Bulbo). Fazendo o exercício de agrupar essas regiões em um sistema, esse seria

o sistema límbico. Teríamos como componentes específicos desse sistema o Nucleus accumbens [f:estrutura integradora de informação na mediação de comportamentos direcionados] (129) e a amígdala [f: papel na resposta emocional, papel integrador nas atividades comportamentais, vegetativas e endócrinas dos animais em sua relação com o ambiente] (130). As outras regiões, não são estritamente componentes do sistema límbico, mas são conectadas funcional e/ou anatomicamente com o mesmo – o cortex entorrinal [f: memória: codificação do tempo e sua ligação a eventos (131); 1/3 de suas aferências é proveniente do cortex olfatório (132); o hipotálamo [f: integrador de respostas autonômicas, endócrinas e sono para homeostase e adaptação] (133); controle hedônico do apetite (134), e o cortex olfatório [f: processamento da informação odorífera via receptores, convergência axonal de neurônios que expressam determinados receptores odoríferos, que resultam na formação de mapas de odores no bulbo olfatório e no cortex] (135); Tradicionalmente, as áreas olfatórias cerebrais são a área neocortical e a área límbica, esta última substrato do componente afetivo do odor (136). O número de conexões anatômicas e funcionais entre cada uma dessas regiões é muito grande (137). O sistema límbico dos vertebrados (roedores e humanos incluídos) é essencial para a sobrevivência, uma vez que controla/regula comportamentos inatos (agressão, acasalamento, reações de defesa) e respostas a estímulos de importância emocional, social, motivacional. Especificamente em roedores, a ativação da circuitaria límbica tem início com a estimulação sensorial proveniente da via olfatória, sendo em seguida processada primariamente pela amígdala e pelo hipotálamo (138). Sabidamente, o IAM torna o sistema límbico vulnerável à apoptose(139,140,141).

Com base no que foi exposto, podemos afirmar que o nosso estudo evidenciou, com a utilização de 18F-FDG PET-scan, uma redução estatisticamente significativa na captação de glicose em 9 áreas límbicas de ratos infartados sem tratamento. Nesse grupo, uma assimetria na captação pode ser observada, uma vez que a amígdala E, o Cortex entorrinal E e o Cortex olfatório E não exibiram o mesmo fenômeno nas estruturas correspondentes do lado direito. Nos ratos infartados *com* tratamento (IAM+PI), das 9 áreas límbicas que se mostravam hipocaptantes nos ratos infartados *sem* tratamento, apenas 5 mostraram redução na captação de glicose. Ou seja, ratos em uso de piridostigmina mostraram menos regiões com captação reduzida do que os infartados, o que pode indicar um efeito protetor não uniforme do fármaco.

Nos parâmetros hemodinâmicos, os valores da pressão arterial sistólica, da pressão arterial diastólica e da pressão arterial média foram menores nos grupos infartados (IAM e IAM+PI) quando comparados ao grupo Sham, evidenciando um efeito hipotensor do infarto; nenhuma diferença, no entanto, foi observada na comparação entre o grupo tratado e o grupo não tratado (IAM+PI vs IAM). A FC não apresentou diferenças intergrupos. Efeitos terapêuticos da piridostigmina sobre parâmetros e cronotrópicos provocados pelo IAM não foram observados.

A hipotensão observada imediatamente depois de um IAM por causa do comprometimento do desempenho cardíaco é um dado consistente em outros estudos com ratos (18,142). Em um estudo recente (27), uma PAD elevada, verificada no grupo de ratos infartados sem tratamento, teve seu valor reduzido no grupo de ratos infartados que tomaram piridostigmina, aproximando os ratos desse último grupo aos ratos do grupo Sham.

Com relação aos parâmetros autonômicos (VFC), os resultados obtidos no nosso estudo foram de caráter comprobatório: em seguida ao IAM, ocorre um desequilíbrio no balanço autonômico, caracterizado por um aumento da atividade simpática e um decaimento na atividade parassimpática (27,69,16,143); a piridostigmina promove efeitos autonômicos, evidenciados pelo aumento da atividade vagal melhorada por uma inibição de cerca de 40% da atividade da acetilcolinesterase (27,28).

No domínio do tempo, a medida primária para estimativa das alterações mediadas pelo vago a RMSSD aumentou no infarto tratado versus o infarto não tratado IAM mostrando um efeito robusto na modulação vagal pela piridostigmina, aumentando a VFC.

Os resultados da VFC no domínio da frequência mostram que o grupo IAM+PI apresentou valores significativamente mais altos na banda LF (nu) e na banda HF (nu) em comparação aos grupos Sham e IAM, ou seja, aumentou as atividades simpática e parassimpática, ao mesmo tempo em que trouxe o balanço simpatovagal para valores semelhantes ao do grupo Sham. Interessante notar o efeito parassimpático e simpático da piridostigmina, apesar de maior no parassimpático, como esperado. O cálculo do barorreflexo pelo índice-ALFA mostrou valores mais altos na sensibilidade do barorreceptor nos ratos tratados com piridostigmina, o que pode indicar um ajuste diferencial do papel autonômico mediado pela droga, tal qual ocorre após sessões de exercício físico (144,145). Pode-se aventar também um ganho na atividade vagal do nervo depressor aórtico promovido pela inibição da acetilcolinesterase.

A VARPAS (variabilidade da pressão arterial sistólica) mostrou valores diminuídos nos ratos infartados dos 2 grupos em relação aos do grupo Sham, sem a

observação de efeito da piridostigmina sobre essa variável. Isto talvez se deva ao fato de que o componente BF, tido como modulador simpático vascular (146) não ter sofrido o efeito da estimulação farmacológica.

A avaliação do miocárdio com ecodopplercardiografia mostrou um comprometimento morfológico causador de disfunção sistólica e diastólica do VE. As variáveis diâmetro, volume e área, com valores aumentados nos ratos infartados, foram atenuadas nos ratos sob tratamento. A disfunção sistólica foi evidenciada por uma redução significativa na VE FAC% no rato infartado sem tratamento; este efeito, no entanto, foi compensado nos ratos tratados com piridostigmina. A disfunção diastólica, evidenciada por um aumento nos números da razão E/A nos ratos infartados, foi corrigida nos animais tratados, com os valores da razão E/A chegando a níveis similares aos ratos do grupo Sham. Portanto, foi constatado um efeito protetor da droga sobre a disfunção sistólica e diastólica ventricular esquerda, otimizando o miocárdio. A questão da disfunção ventricular que se segue à lesão causada pelo infarto, está associada e tem implicações no processo de remodelação miocárdica, via estímulos hemodinâmicos e neuro-hormonais que, com o tempo, produzem alterações cardíacas piorando a insuficiência cardíaca (147,148).

Talvez seja possível que a manutenção do tratamento com piridostigmina por um tempo maior que 7 dias possa resultar numa melhora sustentada sobre os parâmetros ecocardiográficos das funções sistólica e diastólica em ratos infartados (28).

No PET-scan miocárdico, não foram observados resultados apontando diferenças intergrupos nos animais estudados. Uma diminuição na captação miocárdica do traçador foi observada nos ratos infartados, porém sem relevância

estatística, com os valores voltando a aumentar nos animais que usaram piridostigmina, com padrão discreto de uma curva em “u” na variável LAD (artéria coronária descendente, a artéria onde o rato sofreu a indução do infarto, com os valores 3,1 [Sham], 2,4 [IAM] e 2,7 [IAM+PI]. Isto indica a presença de um fenômeno biológico sem a correspondência estatística esperada. Não sabemos explicar esse fenômeno. Apenas, apoiados em dados da literatura (149) sugerir uma explicação: as análises dos SUVs, no estudo citado, mostraram um metabolismo aumentado no ventrículo esquerdo não infartado de ratos SHR, quando comparados a ratos WKY. Ratos SHR sem tratamento anti-hipertensivo evoluem para o padrão clássico de cardiomiopatia hipertensiva (espessamento da parede ventricular esquerda, aumento de colágeno e aumento na utilização de glicose) (149). Também em um estudo recente, foi observado um aumento na captação de glicose em SHRs, com os autores afirmando que a sobrecarga pressórica cardíaca crônica causa alterações metabólicas e aumento na captação de glicose (150). Portanto, esses ratos apresentam um metabolismo miocárdico energético da glicose aumentado. O que nos leva a perguntar se, devido a esse metabolismo basal de glicose *aumentado*, ratos SHR (e que está associado a níveis mais elevados de captação de glicose), não teriam, mesmo sendo infartados, uma redução na captação insuficiente para mostrar um resultado estatisticamente significativo?

Em humanos, estudos apontam que o aumento no metabolismo da glicose na doença cardíaca inicial é um mecanismo adaptativo protetor, um remodelamento metabólico associado à insuficiência cardíaca (151).

A expressão gênica dos genes avaliados no nosso estudo permitiu observar a ausência de um quadro inflamatório relevante nos ratos infartados. Apesar do

achado chamar a atenção, há estudos que “falharam” em mostrar alterações de citocinas *plasmáticas* após dano cardíaco (152,153); essa observação, no entanto, não exclui que tais marcadores inflamatórios não estejam elevados em momentos diferentes. Devemos lembrar também que as citocinas são moléculas moduladoras da inflamação aguda e crônica, às vezes com uma interação aparentemente contraditória (37). Ao mesmo tempo, pudemos observar um quadro inflamatório patente nos ratos infartados tratados com piridostigmina, caracterizado por valores aumentados na expressão gênica de citocinas do VE no 7º dia de infarto, com valores estatisticamente significantes nas citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-17A e TNF- α e na citocina anti-inflamatória IL-10 (IAM+PI vs IAM). Isto coloca de imediato uma questão: o painel inflamatório de expressão gênica foi induzido pela piridostigmina? poderia sugerir um efeito facilitador (?) da piridostigmina na expressão gênica? A piridostigmina, no entanto, é sabidamente uma droga de ação periférica. A questão sobre a possibilidade da piridostigmina atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e atuar no cérebro em situações de estresse foi aventada há uns 20 anos atrás, mas a suposta inibição da colinesterase não foi reproduzida experimentalmente (154). No mesmo trabalho, os autores afirmam que não a piridostigmina, mas a fisostigmina, foi indutora de uma diminuição na colinesterase cerebral em todos os experimentos. Essa questão é de suma importância no nosso estudo, pois também há referências de que a piridostigmina, em condições onde a BHE seja disfuncional (possível em ratos SHR), possa chegar ao SNC, provocar alterações na excitabilidade cortical e levar a alterações na expressão gênica (155).

A quantidade de estudos na área cardiovascular envolvendo perfis de expressão gênica tem crescido muito (156). No contexto do infarto agudo do miocárdio e seu reparo, a importância da expressão gênica de citocinas no tecido

cardíaco tem papel de grande importância, uma vez que um desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias são determinantes no processo de cicatrização e remodelamento do miocárdio infartado (7). Logo depois do infarto, são geradas, além de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias com papel chave na regulação da resposta inflamatória, tais como IL-1, TNF, IL-6, and IL-18 (157). Por outro lado, o paradigma de que citocinas e quimiocinas pioram a lesão isquêmica e o remodelamento ventricular é conflitante com estudos que mostram uma resposta cardioprotetora desses mediadores (158). Portanto, a polarização existente entre “bom” e “ruim” na resposta inflamatória deve ser relativizada.

A IL-17 promove o remodelamento ventricular depois do IAM e sua presença aumentada agrava as fases aguda e tardia do mesmo, via apoptose de cardiomiócitos (159). Por outro lado, há estudos onde níveis aumentados de IL-17 estariam associados a uma melhor evolução cardiovascular, diminuindo a mortalidade (160,161). A IL-6 é uma citocina produzida localmente logo no início do processo inflamatório em resposta a injúrias teciduais (162). O TNF- α , basicamente de efeito pró-inflamatório, promove adesividade celular leucocitária (neutrófilos, monócitos e linfócitos) mediante o aumento na expressão de receptores de superfície endoteliais, com um papel reconhecidamente importante no infarto do miocárdio. É uma citocina gerada em grande quantidade no miocárdio logo depois do infarto, capaz de ativar outras citocinas como IL-1 e IL-6, com papel fundamental na resposta tecidual inflamatória; além disso, o TNF- α exibe um fator preditivo (163). Uma particularidade biológica do TNF- α de grande interesse no nosso estudo, é a diversidade de vias de sinalização que mudam em diferentes momentos, não só no infarto, como também na insuficiência cardíaca (164). Daí o interesse em drogas antagonistas de TNF- α . Dentre as moléculas que possuem um

efeito primordial no controle da resposta inflamatória, a IL-10 é uma das mais potentes e significantes, com efeito imunossupressor que regula a geração de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-12 (165).

6. CONCLUSÃO

Basicamente e com interesses em sua aplicabilidade clínica, esse estudo procurou investigar os possíveis efeitos terapêuticos da piridostigmina na inflamação (modulação do reflexo anti-inflamatório vagal sistêmica e local) e na função miocárdica (melhora da função cardíaca) em ratos SHR submetidos a IAM. Tratou-se também de investigar, com o uso de imagens de PET-scan 18-FDG, o quanto o metabolismo energético de glicose miocárdico e cerebral estariam afetados nesses animais. Observando-se conjuntamente diversos parâmetros envolvendo diferentes sistemas, poder-se-ia obter uma resposta à pergunta: a piridostigmina, um anticolinesterásico de ação periférica, atenuando os efeitos deletérios provocados pela indução de infarto agudo do miocárdio, melhoraria também o metabolismo cerebral representado por um aumento na captação de glicose ao PET-scan? O tratamento com 7 dias de piridostigmina causou significativa melhora em diversos parâmetros morfofuncionais do coração. Os achados mais marcantes do estudo são: a) uma assimetria na captação de glicose por estruturas/regiões cerebrais associadas ao sistema límbico: áreas cerebrais que mostraram redução no metabolismo energético da glicose em ratos infartados, não apresentaram o mesmo fenômeno nos ratos infartados que receberam piridostigmina; b) um aumento na expressão gênica de mRNA de citocinas do ventrículo esquerdo, tanto com perfil pró- quanto anti-inflamatório. Tais resultados

sugerem que a piridostigmina tem efeitos sobre o metabolismo energético da glicose cerebral e sobre a expressão gênica de citocinas cardíacas. Estudos futuros que utilizem a piridostigmina no infarto do miocárdio podem endossar a escolha dessa droga como forma de tratamento de uma condição que afeta diferentes sistemas biológicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Das SR, Delling FN, Djousse L, Elkind MSV, Ferguson JF, Fornage M, Jordan LC, Khan SS, Kissela BM, Knutson KL, Kwan TW, Lackland DT, Lewis TT, Lichtman JH, Longenecker CT, Loop MS, Lutsey PL, Martin SS, Matsushita K, Moran AE, Mussolino ME, O'Flaherty M, Pandey A, Perak AM, Rosamond WD, Roth GA, Sampson UKA, Satou GM, Schroeder EB, Shah SH, Spartano NL, Stokes A, Tirschwell DL, Tsao CW, Turakhia MP, VanWagner LB, Wilkins JT, Wong SS, Virani SS; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2019 Mar 5;139(10):e56-e528.
2. 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 May 1;302(9):H1884-93.

3. Guillén I, Blanes M, Gómez-Lechón M-J, Castell JV. Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 β and IL-6. *Am. J. Physiol.* 269 (Regulatory Integrative Comp. Physiol.38); R229-R235, 1995.

4. Djurdjevic PM, Arsenijevic NN, Baskic DD, Djukic AL, Popovic S, Samardzic G. Systemic response of peripheral blood leukocytes and their phagocytic activity during acute myocardial infarction. *Exp Clin Cardiol* 2001;6(3):159-166.

5. Balbay Y, Tikiz H, Baptiste RJ, Ayaz S, Sasmar H, Korkmaz S. Circulating Interleukin-1 Beta, Interleukin-6, Tumor Necrosis Factor-Alpha, and Soluble ICAM-1 in Patients with Chronic Stable Angina and Myocardial Infarction. *Angiology* 2001; 52:109-114, 2001.

6. Kohsaka S, Menon V, Lowe AM, Lange M, Dzavik V, Sleepe LA, Hochman JS. Systemic Inflammatory Response Syndrome After Acute Myocardial Infarction Complicated by Cardiogenic Shock. *Arch Intern Med.* 2005; 165:1643-1650.

7. Lachtermacher S, Esporcatte BLB, Montalvão F, Costa PC, Rodrigues DC, Belem L, Rabischoffsky A, Faria Neto HCC, Vasconcellos R, Iacobas S, Iacobas DA, Dohmann HFR, Spray DC, Goldenberg RCS, Campos-de-Carvalho AC. Cardiac gene expression and systemic cytokine profile are complementary in a murine model of post-ischemic heart failure. *Braz J Med Biol Res.* 2010 April; 43(4): 377–389.

8. Custodis F, Schirmer SH, Baumhäkel M, Heusch G, Böhm M, Laufs U. Vascular pathophysiology in response to increased heart rate. *JACC* Vol. 56, No. 24, 2010 December 7, 2010:1973–83.

9. Reventovich A, Barghash MH and Hochman JS. Management of refractory cardiogenic shock. *NATURE REVIEWS | CARDIOLOGY* 2016 Aug; vol (13):481 – 492.

10. Mulder P, Richard V, Thuillez C. Endothelin antagonism in experimental ischemic heart failure: hemodynamic, structural and neurohumoral effects. *Heart Fail Rev.* 2001 Dec;6(4):295-300.

11. Dobrucki, L. W. & Sinusas, A. J. Nat. Rev. Cardiol. 7, 38–47 (2010); published online 24 November 2009.
12. González A, Ravassa S, Beaumont J, López B, Díez J. New Targets to Treat the Structural Remodeling of the Myocardium. J Am Coll Cardiol 2011; 58:1833–43.
13. Gabriel-Costa D. The pathophysiology of myocardial infarction-induced heart failure, Pathophysiology (2018), <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2018.04.003>.
14. Berntson GG, Normana GJ, Hawkleyb LC, Cacioppob JT. Cardiac Autonomic Balance vs. Cardiac Regulatory Capacity. Psychophysiology. 2008 July; 45(4): 643–652.
15. Okazaki Y, Zheng C, Li M, Sugimachi M. Effect of the cholinesterase inhibitor donepezil on cardiac remodeling and autonomic balance in rats with heart failure. J Physiol Sci (2010) 60:67–74.
16. Pyner, S. The paraventricular nucleus and heart failure. Exp Physiol. 2014 Feb;99(2):332-9.
17. Durand MT, Becari C, Oliveira MD, do Carmo JM, Aguiar Silva CA, et al. Pyridostigmine Restores Cardiac Autonomic Balance after Small Myocardial Infarction in Mice. PLoS ONE 2004. 9(8): e104476.
18. Santos-Almeida FM, Girão H, Aguiar da Silva CA, Salgado HC, Fazan R Jr. Cholinergic stimulation with pyridostigmine protects myocardial infarcted rats against ischemic-induced arrhythmias and preserves connexin43 protein. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2015; 308: H101–H107.
19. Kalla M, Herring N, Paterson DJ. Cardiac sympatho-vagal balance and ventricular arrhythmia. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical 199 (2016)29–37.

20. Swirski FK, Nahrendorf M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science*. 2013; 339:161–6. [PubMed: 23307733].
21. Rischpler C, Dirschinger RJ, Nekolla SG, Kossmann H, Nicolosi S, Hanus F, van Marwick S, Kunze KP, Meinicke A, Götze K, Kastrati A, Langwieser N, Ibrahim T, Nahrendorf M, Schwaiger M, Laugwitz KL. Prospective Evaluation of 18F-Fluorodeoxyglucose Uptake in Postischemic Myocardium by Simultaneous Positron Emission Tomography/Magnetic Resonance Imaging as a Prognostic Marker of Functional Outcome. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2016 Apr;9(4):e004316.
22. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*. 2007; 204:3037–47. [PubMed: 18025128].
23. Zhu SN, Chen M, Jongstra-Bilen J, Cybulsky MI. GM-CSF regulates intimal cell proliferation in nascent atherosclerotic lesions. *J Exp Med*. 2009; 206:2141–9. [PubMed: 19752185].
24. Frangogiannis NG. The immune system and the remodeling infarcted heart: cell biological insights and therapeutic opportunities. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014 Mar;63(3):185-95.
25. van der Laan AM, Hirsch A, Robbers LF, Nijveldt R, Lommerse I, Delewi R, van der Vleuten PA, Biemond BJ, Zwaginga JJ, van der Giessen WJ, Zijlstra F, van Rossum AC, Voermans C, van der Schoot CE, Piek JJ. A proinflammatory monocyte response is associated with myocardial injury and impaired functional outcome in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: monocytes and myocardial infarction. *Am Heart J*. 2012; 163:57–65. e2. [PubMed: 22172437].
26. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, Seiler S, Binder N, Ege P, Grosse-Dunker G, Heisel I, Hornof F, Jeken J, Rebling NM, Ulrich C, Scheller B, Böhm M, Fliser D, Heine GH. CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes independently predict cardiovascular events: a

cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012; 60:1512–20. [PubMed: 22999728].

27. Bezerra OC, França CM, Rocha JA, Neves GA, Souza PRM, Teixeira Gomes M, Malfitano C, Loleiro TCA, Dourado PM, Llesuy S, de Angelis K, Irigoyen MCC, Ulloa L, Consolim-Colombo FM. Cholinergic Stimulation Improves Oxidative Stress and Inflammation in Experimental Myocardial Infarction. *Sci Rep*. 2017 Oct 20;7(1):13687.

28. Rocha JA, Ribeiro SP, França CM, Coelho O, Alves G, Lacchini S, Kallás EG, Irigoyen MC, Consolim-Colombo FM. 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 Apr 15;310(8): R697-706.

29. Yan X, Anzai A, Katsumata Y, Matsushashi T, Ito K, Endo J, Yamamoto T, Takeshima A, Shinmura K, Shen W, Fukuda K, Sano M. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2013 Sep;62:24-35.

30. Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation*. 1998 Jul 14;98(2):149-56.

31. Kain V, Prabhu SD, Halade GV. Inflammation revisited: inflammation versus resolution of inflammation following myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2014;109(6):444.

32. Lichý M, Szobi A, Hrdlička J, Horváth C, Kormanová V, Rajtík T, Neckář J, Kolář F, Adameová A. Different signalling in infarcted and non-infarcted areas of rat failing hearts: A role of necroptosis and inflammation. *J Cell Mol Med*. 2019 Sep;23(9):6429-6441. doi: 10.1111/jcmm.14536. Epub 2019 Jul 21.

33. Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res*. 2002 Nov 29;91(11):988-98.
34. Diwan A, Tran T, Misra A, Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: a translational approach. *Curr Mol Med*. 2003 Mar;3(2):161-82.
35. Altara R, Manca M, Sabra R, Eid AA, Booz GW, Zouein FA. Temporal cardiac remodeling post-myocardial infarction: dynamics and prognostic implications in personalized medicine. *Heart Fail Rev*. 2016 Jan;21(1):25-47.
36. Kaplan A, Yabluchanskiy A, Ghali R, Altara R, Booz GW and Zouein FA. Cerebral blood flow alteration following acute myocardial infarction in mice. *Biosci Rep*. 2018 Sep 5;38(5).
37. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Nov;1843(11):2563-2582.
38. Ertl G, Frantz S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2005 Apr 1;66(1):22-32.
39. Thackeray JT. PET Assessment of Immune Cell Activity and Therapeutic Monitoring Following Myocardial Infarction. *Curr Cardiol Rep* (2018) 20:13.
40. Wollenweber T, Roentgen P, Schafer A, Schatka I, Zwadlo C, Brunkhorst T, et al. Characterizing the inflammatory tissue response to acute myocardial infarction by clinical multimodality noninvasive imaging. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2014;7(5):811–8. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.114.001689>.
41. Nahrendorf M, Frantz S, Swirski FK, Mulder WJ, Randolph G, Ertl G, Ntziachristos V, Piek JJ, Stroes ES, Schwaiger M, Mann DL, Fayad ZA. Imaging systemic inflammatory networks in ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Apr 21;65(15):1583-91.

42. Wohleb ES, McKim DB, Sheridan JF, Godbout JP. Monocyte trafficking to the brain with stress and inflammation: a novel axis of immune-to-brain communication that influences mood and behavior. *Front Neurosci.* 2015 Jan 21; 8:447.
43. Tremblay MÈ, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A. The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci.* 2011 Nov 9;31(45):16064-9.
44. Pocock JM, Kettenmann H. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci.* 2007 Oct;30(10):527-35.
45. Stanimirovic DB, Friedman A. Pathophysiology of the neurovascular unit: disease cause or consequence? *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 Jul;32(7):1207-21.
46. Engler H, Bailey MT, Engler A, Stiner-Jones LM, Quan N, Sheridan JF. Interleukin-1 receptor type 1-deficient mice fail to develop social stress-associated glucocorticoid resistance in the spleen. *Psychoneuroendocrinology.* 2008 Jan;33(1):108-17.
47. Wohleb ES, Hanke ML, Corona AW, Powell ND, Stiner LM, Bailey MT, Nelson RJ, Godbout JP, Sheridan JF. β -Adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat. *J Neurosci.* 2011 Apr 27;31(17):6277-88.
48. Francis J, Zhang Z-H, Weiss RM, Felder RB. Neural regulation of the proinflammatory cytokine response to acute myocardial infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2004 287:2, H791-H797.
49. Elkind MSV, Sacco RL. Pathogenesis, Classification, and Epidemiology of Cerebrovascular Disease. Chapter 37. In: Merrit's Neurology, 12th ed. Philadelphia,PA.: LippincottWilliams & Wilkins, 2010.
50. Lecrux C, Bourourou M, Hamel E. How reliable is cerebral blood flow to map changes in neuronal activity? *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 217 (2019) 71–79.

51. Girouard H, Iadecola C, 2006. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol* 100: 328–335, 2006.
52. Lecrux C, Hamel E. The neurovascular unit in brain function and disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011 Sep;203(1):47-59.
53. Braile-Sternieri MCVB, Mustafa EM, Ferreira VRR, Braile Sabino S, Braile Sternieri G, Buffulin de Faria LA, Sbardellini BC, Vianna Queiroz CO, Braile DM, Zotarelli Filho IJ. Main Considerations of Cardiogenic Shock and Its Predictors: Systematic Review. *Cardiol Res*. 2018 Apr;9(2):75-82.
54. Dutt DP, Pinney SP. Clinical variability within the INTERMACS 1 profile: implications for treatment options. *Curr Opin Cardiol*. 2014 May;29(3):244-9.
55. Stevenson LW, Pagani FD, Young JB, Jessup M, Miller L, Kormos RL, Naftel DC, Ulisney K, Desvigne-Nickens P, Kirklin JK. INTERMACS profiles of advanced heart failure: the current picture. *J Heart Lung Transplant*. 2009 Jun;28(6):535-41.
56. Avezum Junior Á, Feldman A, Carvalho AC, et al.; Brazilian Society of Cardiology. [V Guideline of the Brazilian Society of Cardiology on Acute Myocardial Infarction Treatment with ST Segment Elevation]. *Arq Bras Cardiol*. 2015 Aug;105(2 Suppl 1):1-105.
57. Meng L, Hou W, Chui J, Han R, Gelb AW. Cardiac Output and Cerebral Blood Flow: The Integrated Regulation of Brain Perfusion in Adult Humans. *Anesthesiology*. 2015 Nov;123(5):1198-208.
58. Georgiadis D, Sievert M, Cencetti S, Uhlmann F, Krivokuca M, Zierz S, Werdan K. Cerebrovascular reactivity is impaired in patients with cardiac failure. *Eur Heart J*. 2000 Mar;21(5):407-13.

59. Lorenzi-Filho G, Azevedo ER, Parker JD, Bradley TD. Relationship of carbon dioxide tension in arterial blood to pulmonary wedge pressure in heart failure. *Eur Respir J*. 2002 Jan;19(1):37-40.
60. Havakuk O, King KS2, Grazette L, Yoon AJ, Fong M, Bregman N, Elkayam U, Kloner RA. Heart Failure-Induced Brain Injury. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Mar 28;69(12):1609-1616.
61. Pinard E. [Link between cerebral blood flow and brain metabolism: validity and limits]. *Agressologie*. 1991;32(6-7):359-65.
62. Kessler RM. Imaging methods for evaluating brain function in man. *Neurobiol Aging*. 2003 May-Jun;24 Suppl 1:S21-35; discussion S37-9.
63. Dukart J, Holiga Š, Chatham C, Hawkins P, Forsyth A, McMillan R, Myers J, Lingford-Hughes AR, Nutt DJ, Merlo-Pich E, Risterucci C, Boak L, Umbricht D, Schobel S, Liu T, Mehta MA, Zelaya FO, Williams SC, Brown G, Paulus M, Honey GD, Muthukumaraswamy S, Hipp J, Bertolino A, Sambataro F. Cerebral blood flow predicts differential neurotransmitter activity. *Sci Rep*. 2018 Mar 6;8(1):4074.
64. Braunwald E. Heart failure. *JACC Heart Fail*. 2013;1, 1-20.
65. Kishi T. Heart failure as an autonomic nervous system dysfunction. *Journal of Cardiology* 2012 59, 117—122.
66. Bloom MW, Greenberg B, Jaarsma T, Januzzi JL, Lam CSP, Maggioni AP, Trochu, J-N, Butler J. Heart failure with reduced ejection fraction NATURE REVIEWS | DISEASE PRIMERS 2007. VOLUME 3 | ARTICLE NUMBER 17058 | 1-19.
67. Floras JS. Sympathetic nervous system activation in human heart failure: clinical implications of an updated model. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Jul 28;54(5):375-85.

68. Schwartz PJ, De Ferrari GM. Sympathetic-parasympathetic interaction in health and disease: abnormalities and relevance in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2011 Mar;16(2):101-7.

70. Zucker IH, Patel KP, Schultz HD. Neurohumoral stimulation. *Heart Fail Clin.* 2012 Jan;8(1):87-99.

71. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A; Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology, Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S, McDonagh T, Sechtem U, Bonnet LA, Avraamides P, Ben Lamin HA, Brignole M, Coca A, Cowburn P, Dargie H, Elliott P, Flachskampf FA, Guida GF, Hardman S, Jung B, Merkely B, Mueller C, Nanas JN, Nielsen OW, Orn S, Parissis JT, Ponikowski P; ESC Committee for Practice Guidelines. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail.* 2012 Aug;14(8):803-69.

72. Malliani A, Schwartz PJ, Zanchetti A. A sympathetic reflex elicited by experimental coronary occlusion. *Am J Physiol.* 1969 Sep;217(3):703-9.

73. Webb SW, Adgey AA, Pantridge JF. Autonomic disturbance at onset of acute myocardial infarction. *Br Med J.* 1972 Jul 8;3(5818):89-92.

74. Malliani A, Montano N. Emerging excitatory role of cardiovascular sympathetic afferents in pathophysiological conditions. *Hypertension.* 2002 Jan;39(1):63-8.

75. Du YH, Chen AF. A "love triangle" elicited by electrochemistry: complex interactions among cardiac sympathetic afferent, chemo-, and baroreflexes. *J Appl Physiol* (1985). 2007 Jan;102(1):9-10.
76. Bibevski S, Dunlap ME. Evidence for impaired vagus nerve activity in heart failure. *Heart Fail Rev*. 2011 Mar;16(2):129-35.
77. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jap Circ J* 27: 282-93, 1963.
78. Fazan Jr R, Silva VJD, Salgado HC. Modelos de Hipertensão Arterial. *Rev Bras Hipertens* 8: 19-29, 2001.
79. Quintana-Villamandos B, Gomez de Diego JJ, Delgado-Martos MJ, Muñoz-Valverde D, Soto-Montenegro ML, Desco M, Delgado-Baeza E. Dronedarone produces early regression of myocardial remodelling in structural heart disease. *PLoS One*. 2017 Nov 21;12(11): e0188442.
80. Sambandam N, Lopaschuk GD, Brownsey RW and Allard MF. Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart Fail Rev* 2002; 7: 161–173.
81. Minic Z, O'Leary DS, Scislo TJ. NTS adenosine A2a receptors inhibit the cardiopulmonary chemoreflex control of regional sympathetic outputs via a GABAergic mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015 Jul 1;309(1):H185-97.
82. Burnstock G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. *Circ Res*. 2017; 120:207-228.
83. Burnstock G. Blood cells: an historical account of the roles of purinergic signalling. *Purinergic Signal*. 2015 Dec;11(4):411-34.
84. Rodrigues B, Lira FS, Consolim-Colombo FM, Rocha JA, Caperuto EC, De Angelis K, Irigoyen MC. Role of exercise training on autonomic changes and inflammatory profile induced by myocardial infarction. *Mediators Inflamm*. 2014; 2014:702473.

85. Brock JA, Van Helden DF. Enhanced excitatory junction potentials in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Pflugers Arch*. 1995 Oct;430(6):901-8.
86. Fujishima M1, Ibayashi S, Fujii K, Mori S. Cerebral blood flow and brain function in hypertension. *Hypertens Res*. 1995 Jun;18(2):111-7.
87. Wei L, Lin SZ, Tajima A, Nakata H, Acuff V, Patlak C, Pettigrew K, Fenstermacher J. Cerebral glucose utilization and blood flow in adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1992 Oct;20(4):501-10.
88. Peters A, McEwen BS. Stress habituation, body shape and cardiovascular mortality. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015 Sep; 56:139-50.
89. McEwen BS, Wingfield JC. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav*. 2003 Jan;43(1):2-15.
90. McEwen BS, Wingfield JC. What is in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. *Horm Behav*. 2010 Feb;57(2):105-11.
91. Nordlander MI. Functional consequences of structural adaptation of the heart in hypertension. *Hypertension*. 1984 Nov-Dec;6(6 Pt 2):III58-63.
92. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000 May 25;405(6785):458-62.
93. Tracey, K. J. (2002). The inflammatory reflex. *Nature* 420, 853–859. doi: 10.1038/nature01321.
94. Huston JM, Tracey KJ. The pulse of inflammation: heart rate variability, the cholinergic anti-inflammatory pathway and implications for therapy. *J Intern Med*. 2011 Jan;269(1):45-53.

95. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*. 2003 Jan 23;421(6921):384-8.
96. Rosas-Ballina M, Tracey KJ. Cholinergic control of inflammation. *J Intern Med*. 2009 Jun;265(6):663-79.
97. Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdés-Ferrer SI, Levine YA, Reardon C, Tusche MW, Pavlov VA, Andersson U, Chavan S, Mak TW, Tracey KJ. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science*. 2011 Oct 7;334(6052):98-101.
98. Zila I, Mokra D, Kopincova J, Kolomaznik M, Javorka M, Calkovska A. Vagal-immune interactions involved in cholinergic anti-inflammatory pathway. *Physiol Res*. 2017 Sep 22;66(Supplementum 2): S139-S145.
99. Zhao M, He X, Bi XY, Yu XJ, Gil Wier W, Zang WJ. Vagal stimulation triggers peripheral vascular protection through the cholinergic anti-inflammatory pathway in a rat model of myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol*. 2013 May;108(3):345.
100. Tracey KJ. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol*. 2009 Jun;9(6):418-28.
101. Pavlov VA, Tracey KJ. Neural regulation of immunity: molecular mechanisms and clinical translation. *Nat. Neurosci*. 2017;20, 156-166.
102. Tracey, KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest*. 2007;117(2):289-296.
103. Sousa-Valente J, Brain SD. A historical perspective on the role of sensory nerves in neurogenic inflammation. *Seminars in Immunopathology* (2018) 40:229–236

104. Julius D (2013) TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 29:355–384.
105. Chiu IM, von Hehn CA, Woolf CJ. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. *Nat Neurosci*. 2012 Jul 26;15(8):1063-7. doi: 10.1038/nn.3144.
106. Andersson U, Tracey KJ. Reflex Principles of Immunological Homeostasis. *Annu Rev Immunol*. 2011.
107. Lasselin J et al. Sex differences in how inflammation affects behavior: What we can learn from experimental inflammatory models in humans. *Frontiers in Neuroendocrinology* (2018).
108. Heurilig K, Leuzy A, Jonasson M, Frick A, Zimmer E, Nordberg A, Lubberink M. Quantitative positron emission tomography in brain research. *Brain Research* (2017).
109. Nahrendorf M, Keliher E, Marinelli B, Waterman P, Feruglio PF, Fexon L, Pivovarov M, Swirski FK, Pittet MJ, Vinegoni C, Weissleder R. Hybrid PET-optical imaging using targeted probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 27;107(17):7910-5.
110. Lee WW, Marinelli B, van der Laan AM, Sena BF, Gorbato R, Leuschner F, Dutta P, Iwamoto Y, Ueno T, Begieneman MP, Niessen HW, Piek JJ, Vinegoni C, Pittet MJ, Swirski FK, Tawakol A, Di Carli M, Weissleder R, Nahrendorf M. PET/MRI of inflammation in myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Jan 10;59(2):153-63.
111. Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol*. 2005 Dec;6(12):1182-90.
112. Gargiulo S, Greco A, Gramanzini M, Petretta MP, Ferro A, Larobina M, Panico M, Brunetti A, Cuocolo A. PET/CT imaging in mouse models of myocardial ischemia. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012:541872.

113. Vandoorne K, Nahrendorf M. Multiparametric Imaging of Organ System Interfaces. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2017 Apr;10(4). pii: e005613.

114. Kim EJ, Kim S, Kang DO, Seo HS. Metabolic activity of the spleen and bone marrow in patients with acute myocardial infarction evaluated by 18f-fluorodeoxyglucose positron emission tomographic imaging. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2014 May;7(3):454-60.

115. Farmakidis C, Pasnoor M, Dimachkie MM, Barohn RJ. Treatment of Myasthenia Gravis. *Neurol Clin*. 2018 May;36(2):311-337.

116. Feriani DJ, Souza GIH, Carrozzi NM, Mostarda C, Dourado PMM, Consolim-Colombo FM, De Angelis K, Moreno H, Irigoyen MC, Rodrigues B. Impact of exercise training associated to pyridostigmine treatment on autonomic function and inflammatory profile after myocardial infarction in rats. *Int J Cardiol*. 2017 Jan 15; 227:757-765.

117. Soares PP, da Nóbrega AC, Ushizima MR, Irigoyen MC. Cholinergic stimulation with pyridostigmine increases heart rate variability and baroreflex sensitivity in rats. *Auton Neurosci* 113, 24-31 (2004).

118. Wang X, Yang Z, Xue B, Shi H. Activation of the cholinergic antiinflammatory pathway ameliorates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Endocrinology* 152, 836-846 (2011).

119. Cerqueira MD, Weissman NJ, Dilsizian V, Jacobs AK, Kaul S, Laskey WK, Pennell DJ, Rumberger JA, Ryan T, Verani MS; American Heart Association Writing Group on Myocardial Segmentation and Registration for Cardiac Imaging. Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart. A statement for healthcare professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. *Circulation*. 2002 Jan 29;105(4):539-42.

120. Yang T, Lu Z, Wang L, Zhao Y, Nie B, Xu Q, Han X, Li T, Zhao J, Cheng W, Wang B, Wu A, Zhu H, Meng W, Shang H, Zhao M. Dynamic Changes in Brain Glucose Metabolism and Neuronal Structure in Rats with Heart Failure. *Neuroscience*. 2020 Jan 1; 424:34-44.

121. Lu X, Xiang li, Marcus Hacker, and Xiaoli Zhang. Brain glucose metabolism was decreased in patients with ischemic cardiomyopathy and severe left ventricular dysfunction: insights from functional and metabolic of 18F-FDG PET/CT imaging. *J Nucl Med* 2017 58:371.

122. Lu X, Binbin Nie, Ziwei Zhu, Hongzhi Mi, Xiaofen Xie, Xiang Li, Marcus Hacker, Yongxiang Wei and Xiaoli Zhang. 18F-FDG PET/CT evaluation of changes on cerebral glucose metabolism in patients with ischemic heart disease and heart failure. *J Nucl Med* 2018 59:227.

123. Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L. Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1990 Summer;2(2):161-92.

124. Goldstein LB. Should Antihypertensive Therapies be Given to Patients with Acute Ischaemic Stroke? *Drug Safety* 2000 Jan; 22 (1): 13-18.

125. Fok H, Guilcher A, Brett S, Jiang B, Li Y, Epstein S, Alastruey J, Clapp B, Chowienczyk P. Dominance of the forward compression wave in determining pulsatile components of blood pressure: similarities between inotropic stimulation and essential hypertension. *Hypertension*. 2014 Nov;64(5):1116-23.

126. Trudeau L. Central blood pressure as an index of antihypertensive control: determinants and potential value. *Can J Cardiol*. 2014 May;30(5 Suppl):S23-8.

127. Li Y, Gu H, Fok H, Alastruey J, Chowienczyk P. Forward and Backward Pressure Waveform Morphology in Hypertension. *Hypertension*. 2017 Feb;69(2):375-381.

128. Raphael CE, Frenneaux M. Wave intensity and cognitive decline: where the heart leads the mind follows. *Eur Heart J*. 2019 Jul 21;40(28):2310-2312.
129. Scofield MD, Heinsbroek JA, Gipson CD, Kupchik YM, Spencer S, Smith AC, Roberts-Wolfe D, Kalivas PW. The Nucleus Accumbens: Mechanisms of Addiction across Drug Classes Reflect the Importance of Glutamate Homeostasis. *Pharmacol Rev*. 2016 Jul;68(3):816-71.
130. Rasia-Filho AA, Londero RG, Achaval M. Functional activities of the amygdala: an overview. *J Psychiatry Neurosci*. 2000 Jan;25(1):14-23. PMID: 10721680; PMCID: PMC1407702.
131. Tsao A, Sugar J, Lu L, Wang C, Knierim JJ, Moser MB, Moser EI. Integrating time from experience in the lateral entorhinal cortex. *Nature*. 2018 Sep;561(7721):57-62.
132. Vismer MS, Forcelli PA, Skopin MD, Gale K and Koubeissi MZ. The piriform, perirhinal, and entorhinal cortex in seizure generation. *Front. Neural Circuits*, 29 May 2015 | <https://doi.org/10.3389/fncir.2015.00027>.
133. Coon EA, Cutsforth-Gregory JK, Benarroch EE. Neuropathology of autonomic dysfunction in synucleinopathies. *Mov Disord*. 2018 Mar;33(3):349-358.
134. Berthoud HR, Münzberg H, Morrison CD. Blaming the Brain for Obesity: Integration of Hedonic and Homeostatic Mechanisms. *Gastroenterology*. 2017 May;152(7):1728-1738.
135. Yamaguchi M. Functional Sub-Circuits of the Olfactory System Viewed from the Olfactory Bulb and the Olfactory Tubercle. *Front. Neuroanat.*, 11 April 2017 | <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00033>.
136. Soudry Y, Lemogne C, Malinvaud D, Consoli SM, Bonfils P. Olfactory system and emotion: common substrates. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2011 Jan;128(1):18-23.

137. Nieuwenhuys R. The insular cortex: a review. *Prog Brain Res*. 2012;195:123-63.
138. Sokolowski K, Corbin JG. Wired for behaviors: from development to function of innate limbic system circuitry. *Front Mol Neurosci*. 2012 Apr 26;5:55.
139. Wann BP, Boucher M, Kaloustian S, Nim S, Godbout R, Rousseau G. Apoptosis detected in the amygdala following myocardial infarction in the rat. *Biol Psychiatry*. 2006 Mar 1;59(5):430-3.
140. Wann BP, Bah TM, Boucher M, Courtemanche J, Le Marec N, Rousseau G, Godbout R. Vulnerability for apoptosis in the limbic system after myocardial infarction in rats: a possible model for human postinfarct major depression. *J Psychiatry Neurosci*. 2007 Jan;32(1):11-6.
141. Kaloustian S, Wann BP, Bah TM, Girard SA, Apostolakis A, Ishak S, Mathieu S, Ryvlin P, Godbout R, Rousseau G. Apoptosis time course in the limbic system after myocardial infarction in the rat. *Brain Res*. 2008 Jun 24;1216:87-91.
142. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res*. 1979 Apr;44(4):503-12
143. de La Fuente RN, Rodrigues B, Moraes-Silva IC, Souza LE, Sirvente R, Mostarda C, De Angelis K, Soares PP, Lacchini S, Consolim-Colombo F, Irigoyen MC. Cholinergic stimulation with pyridostigmine improves autonomic function in infarcted rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013 Sep;40(9):610-6.
144. Silva GJ, Brum PC, Negrão CE, Krieger EM. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997 Sep;30(3 Pt 2):714-9.

145. Minami N, Mori N, Nagasaka M, Ito O, Kurosawa H, Kanazawa M, Kaku K, Lee E, Kohzuki M. Mechanism behind augmentation in baroreflex sensitivity after acute exercise in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2006 Feb;29(2):117-22.
146. Stauss HM. Power spectral analysis in mice: What are the appropriate frequency bands? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007 Feb;292(2):R902-3.
147. Cicogna A C, Okoshi M P, Okoshi K. História natural da remodelação miocárdica: da agressão aos sintomas. *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo*;10(1):8-16, jan.-fev. 2000.
148. Schirone L, Forte M, Palmerio S, Yee D, Nocella C, Angelini F, Pagano F, Schiavon S, Bordin A, Carrizzo A, Vecchione C, Valenti V, Chimenti I, De Falco E, Sciarretta S, Frati G. A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:3920195.
149. Quintana-Villamandos B, Delgado-Martos, MJ, Fernandez-Riveira C, Fernández-Criado MC, Martos-Rodríguez A, Canillas F and Delgado-Baeza E. Can ¹⁸F-FDG–PET show differences in myocardial metabolism between Wistar Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats? *Lab Anim.* 2013 Oct;47(4):320-3.
150. Li J, Kemp BA, Howell NL, Massey J, Mińczuk K, Huang Q, Chordia MD, Roy RJ, Patrie JT, Davogustto GE, Kramer CM, Epstein FH, Carey RM, Taegtmeier H5, Keller SR, Kundu BK. Metabolic Changes in Spontaneously Hypertensive Rat Hearts Precede Cardiac Dysfunction and Left Ventricular Hypertrophy. *J Am Heart Assoc.* 2019 Feb 19;8(4):e010926.
151. Tran DH, Wang Z V. Glucose Metabolism in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *JAHA* 2019;8:e012673.
152. Vistnes M, Waehre A, Nygård S, Sjaastad I, Andersson KB, Husberg C, Christensen G. Circulating cytokine levels in mice with heart failure are etiology dependent. *J Appl Physiol (1985).* 2010 May;108(5):1357-64.

153. Gouweleeuw L, Pol C, Simonides WS, de Kleijn DP, Schoemaker RG. Evidence for neuroinflammation after myocardial infarction in a mouse model. *Heart Mind* 2017;1:134-40.
154. Grauer E, Alkalai D, Kapon J, Cohen G, Raveh L. Stress does not enable pyridostigmine to inhibit brain cholinesterase after parenteral administration. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000 May 1;164(3):301-4.
155. Pavlovsky L, Browne RO, Friedman A. Pyridostigmine enhances glutamatergic transmission in hippocampal CA1 neurons. *Exp Neurol*. 2003 Feb;179(2):181-7.
156. Henriksen PA1, Kotelevtsev Y. Application of gene expression profiling to cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2002 Apr;54(1):16-24.
157. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*. 2016 Jun 24;119(1):91-112.
158. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res*. 2004 Jun 25;94(12):1543-53.
159. Zhou SF, Yuan J, Liao MY, Xia N, Tang TT, Li JJ, Jiao J, Dong WY, Nie SF, Zhu ZF, Zhang WC, Lv BJ, Xiao H, Wang Q, Tu X, Liao YH, Shi GP, Cheng X. IL-17A promotes ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Mol Med (Berl)*. 2014 Oct;92(10):1105-16.
160. Simon T, Taleb S, Danchin N, Laurans L, Rousseau B, Cattan S, Montely JM, Dubourg O, Tedgui A, Kotti S, Mallat Z, 2013. Circulating levels of interleukin-17 and cardiovascular outcomes in patients with acute myocardial infarction. *Eur. Heart J*. 34 (8), 570–577.

161. Mora-Ruíz MD, Blanco-Favela F, Chávez Rueda AK, Legorreta-Haquet MV1, Chávez-Sánchez L. Role of interleukin-17 in acute myocardial infarction. *Mol Immunol*. 2019 Mar;107:71-78.
162. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, immunity, and disease. *Cold spring harbor perspectives in biology*, v. 6, n. 10, 2014.
163. Mahmoud AH, Taha NM, Zakhary M, Tadros MS. PTEN gene & TNF-alpha in acute myocardial infarction. *Int J Cardiol Heart Vasc*. 2019 Apr 29; 23:100366.
164. Tian M, Yuan YC, Li JY, Gionfriddo MR, Huang RC. Tumor necrosis factor- α and its role as a mediator in myocardial infarction: A brief review. *Chronic Dis Transl Med*. 2015 Mar 22;1(1):18-26.
165. Jaffer U, Wade, RG, Gourlay T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. *HSR proceedings in intensive care & cardiovascular anesthesia*, v. 2, n. 3, pp. 161–175, 2010.

