

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA

**PAPEL DA ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA NA INFLAMAÇÃO  
NO INFARTO DO MIOCÁRDIO EXPERIMENTAL**

OTÁVIO COELHO BEZERRA

SÃO PAULO

2015

OTÁVIO COELHO BEZERRA

PAPEL DA ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA NA INFLAMAÇÃO  
NO INFARTO DO MIOCÁRDIO EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de  
Mestrado em Medicina da Universidade  
Nove de Julho, para obtenção do título de  
Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Fernanda Marciano Consolim Colombo.

SÃO PAULO

2015

**Bezerra, Otávio Coelho.**

***Papel da estimulação colinérgica na inflamação no infarto do miocárdio experimental. / Otávio Coelho Bezerra. 2015.***

**59 f.**

***Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2015.***

***Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Marciano Consolim Colombo.***

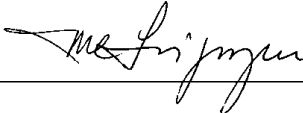
São Paulo, 15 de abril de 2015.

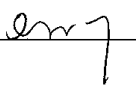
**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno (a): **OTAVIO COELHO BEZERRA**

Título da Dissertação: **“PAPEL DA ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA NA INFLAMAÇÃO NO INFARTO DO MIOCÁRDIO EXPERIMENTAL”**

Presidente: PROFA. DRA. FERNANDA MARCIANO CONSOLIM COLOMBO 

Membro: PROFA. DRA. MARIA CLAUDIA IRIGOYEN 

Membro: PROFA. DRA. CRISTIANE MIRANDA FRANÇA 

**A Deus e minha família**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de minha inspiração!

A minha família, meus pais Flávio Sena Alves Bezerra e Maria do Perpetúo Socorro Coelho Bezerra, minha filha Ana Beatriz Coelho Alvez Botelho, minha irmã Flávia Coelho Bezerra e ao meu primo Ancelmo Coelho pelos valores, apoio, incentivo, força e encorajamento para conseguir realizar este sonho, não foi fácil sair para um local novo, sem conhecer ninguém praticamente. Se não fossem vocês, eu não teria chegado aqui, cada um contribuiu de sua forma, obrigado!

A minha orientadora e amiga Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Fernanda Marciano Consolim Colombo pelo carinho, apoio e muita paciência dedicados, que acima de tudo acreditou em mim para a realização desta pesquisa.

Aos meus eternos professores que possibilitaram a realização deste mestrado Prof. Dr. Marcelo Rubira e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Rubira.

Aos grandes pesquisadores: Alexandre Tavorari, Carine Sangaleti, Cristiano Mostarda, Daniela Farah, Diego, Fernando Santos, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Grazia, Henrique, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Iris Callado, Janaina, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juraci, Kátia, Luciano Eiken, Michele Sartori, Oscar Albuquerque, Pamella Ramona, Paula Cruz, Rebeca Harmon, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvia Beatriz, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Suzan Ribeiro que contribuíram com meu crescimento acadêmico em vários aspectos, valeu a pena!

Aos meus colegas de estudo: Adilson Santos, Adriano Silvio, Fábio Spacassassi, Gabriela Gomes, Gizele Alves, José Antônio Januário, Lucas Andreo, Mozania Reis, Paulo, Regiane Feliciano, Thércio Lemos. A convivência nos tornaram amigos e me permitiu conhecer as pessoas maravilhosas que são, e obrigado por em acolherem sempre com um o sorriso transparente.

Aos técnicos Angela Batista, Leandro e Maycon por estarem sempre dispostos a ajudar e ensinar.

Aos professores da Universidade Nove de Julho, em especial a prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Cristiane França e a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kátia De Angelis pela dedicação e paciência.

Os professores da banca, que aceitaram com amor o convite. Obrigado pelas observações.

Aos meus colegas do Hospital São Camilo: Adriana, Aline, Alissa, Andreia, Ariane, Bruno, Camila, Carlos, Cláudia, Daniela, Elaine Cristiana, Elaine Correia, Fabiana B, Fabiana S, Francielene, Frederico, Gustavo, Ivi, Jéssica, Laila, Larissa,

Lilian, Lucilene, Karina, Lúcia, Luciana, Marina, Matheus, Michele, Patricia, Priscila, Talita, Tatiana, Walquiria e Wellison pela ajuda e incentivo.

Aos meus colegas da clínica de fisioterapia pelo incentivo e momentos de descontração: Adriano, Liziane, Maryeli, Michelle, Pádua, Roberta e Viviane.

Aos meus amigos pelo apoio incondicional: Andreia, Aisa, Alexandre, Alyne, Ana Jéssica, Andréia Guedes, Carla Assunção, Carol, Clívia Roberta, Daniela Dutra, Elisângela, Fernando, Fernanda, Flávio Buchala, Gabriel, Geziel, Geisiane, Gisele Bisconsin, Gretel, Higor, Imolo, Isabela, Ivo Dickow, Izan, Jaqueline, Jessica Mirla, Juceline, Juliane Passos, Juliana Ouro, Juliano Colombo, Keyla, Lázaro, Lenira, Marcia, Marcos Antônio, Margareth, Marly, Naiara, Natalia, Palmer, Priscila, Queite, Rainier, Renato, Robnilson, Sandra, Tatiana Gouveia, Thiago, Vanessa, Vicente, Vinicius, Willian, Yuri e todos aqueles que infelizmente posso ter omitido.

A todos muito obrigado, pois ninguém cresce sozinho sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude positiva, críticas construtivas, cobranças necessárias e até puxões de orelha tive sorte de ter tudo isso.

## RESUMO

**Introdução:** O processo inflamatório que se observa após um infarto do miocárdio (IM) é necessário para a reparação tecidual, contudo se essa resposta for insuficiente ou exacerbada, o paciente pode evoluir com graves manifestações clínicas. A modulação da inflamação, de modo a reprimir as repostas exacerbadas, se mostra um alvo terapêutico promissor. Trabalhos prévios mostraram que a resposta imunológica pode ser modulada com a atuação do sistema nervoso parassimpático, por um reflexo denominado de “reflexo anti-inflamatório colinérgico”. Diversos meios podem ser usados para modular este reflexo, como o uso de fármacos. O brometo de piridostigmina é um potente anticolinesterásico que vem sendo usado pelo nosso grupo e tem evidenciando melhoras funcionais e morfológicas nos estudos conduzidos em estados inflamatórios pós lesão cardíaca. **Objetivo:** Avaliamos se a administração do brometo de piridostigmina modifica a concentração de citocinas pró-inflamatórias (Interleucina 1- $\beta$ , interleucina 6 e TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatória (Interleucina 10) e se altera as populações de células T reg e macrófagos (M1 e M2) no tecido cardíaco lesado após IM em ratos. **Métodos:** utilizamos ratos machos adultos da linhagem Wistar, com peso variando 200 e 250, divididos em grupo controle (CS), grupo infartado não tratado (IC) e grupo infartado tratado (IP). O infarto do miocárdio foi realizado por ligadura da artéria coronária esquerda, o grupo IP foi imediatamente tratado com piridostigmina na dose de 40 mg/kg/dia na água ofertada. No quinto dia, todos os animais foram submetidos à canulação da artéria femoral para registro da pressão arterial (PA) no dia seguinte, extraíndo assim os componentes da variabilidade da frequência cardíaca (VFC). No sétimo dia os animais foram eutanasiados especificamente para a coleta de tecido e dosagem de citocinas pela técnica de ELISA e realização da imunohistóquímica. Os resultados que tiveram comportamento paramétrico foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via, enquanto os resultados com comportamento não paramétrico foram analisados por Kruskal-Wallis. **Resultado:** A pressão arterial diastólica do grupo IP ( $83 \pm 0,3$  mmHg) se apresentou semelhante ao grupo CS ( $82 \pm 0,9$  mmHg) e, estava elevada no grupo IC ( $88 \pm 0,3$  mmHg). Foi observada maior modulação vagal no grupo IP, quando comparado ao grupo IC, pois houve melhora nos componentes de baixa ( $14,7 \pm 1,1$  un vs  $28,7 \pm 4,8$  un) e alta frequência ( $85,4 \pm 1,0$  un vs  $17,2 \pm 5,0$  un), da variabilidade da frequência cardíaca. Além disso, os valores de LF e HF foram semelhantes entre



os grupos IP ( $16,8 \pm 3,0$  e  $83,2 \pm 3,0$  un) e CS ( $14,7 \pm 1,0$  e  $85,4 \pm 1,0$  un). A relação LF/HF no grupo CS ( $0,2 \pm 0,05$ ) e IP ( $0,2 \pm 0,05$ ) também foi semelhante, enquanto que no grupo IC estava elevada ( $0,4 \pm 0,09$ ). A concentração das citocinas pró-inflamatórias foi maior no grupo IC quando comparada ao grupo IP, IL-1 $\beta$  ( $81 \pm 21,8$  vs  $29 \pm 29,5,6$  pg/ml), IL-6 ( $99 \pm 26,6$  vs  $50 \pm 22,4$  pg/ml), TNF- $\alpha$  ( $99 \pm 26,6$  vs  $11 \pm 2,4$  pg/ml) e IL-10 ( $66 \pm 6,8$  vs  $43 \pm 3,0$  pg/ml), sendo que os valores do grupo IP estavam semelhantes aos do grupo CS. A análise imunohistoquímica demonstrou que os macrófagos (M $\emptyset$ ) M1 marcados no grupo IP apresentaram um padrão de distribuição na área de lesão diferente do grupo IC, estando mais concentrados na borda do tecido infartado. Além disso, os M $\emptyset$  M2 do grupo IP estavam mais elevados no sétimo dia após IM quando comparados ao IP. **Conclusão:** Observamos que a administração do anticolinesterásico piridostigmina influencia na mobilização de células inflamatórias na área infartada, reduzindo a relação de macrófagos M1/M2, com significativa redução das concentrações de citocinas pró-inflamatórias no tecido cardíaco de ratos, no 7<sup>o</sup> dia Pos IM.

**Palavra-chave:** Infarto do miocárdio, Inflamação, Neuroimunomodulação, Via anti-inflamatória colinérgica, Ratos Wistar.

## ABSTRACT

**Introduction:** The inflammatory process after a myocardial infarction (MI) is necessary for tissue repair, but if that response is insufficient or exacerbated, the patient may have severe clinical manifestations. The modulation of inflammation to suppress the heightened responses, shown a promising therapeutic target. Previous studies have shown that the immune response can be modulated with the actions of the parasympathetic nervous system, by a reflex called "cholinergic anti-inflammatory reflex". Several means can be used to modulate this reflection, as the use of drugs. The pyridostigmine bromide is a potent anticholinesterase that has been used by our group and indicates improvements in functional and morphological studies in inflammatory states after cardiac injury. **Objective:** To evaluate whether the administration of pyridostigmine bromide modify the concentration of pro-inflammatory cytokines (interleukin 1- $\beta$ , interleukin-6 and TNF- $\alpha$ ) and anti-inflammatory (Interleukin 10) and changes the populations of T reg cells and macrophages (M1 and M2) in cardiac tissue damaged after MI in rats. **Methods:** Adult male rats (Wistar), weighing 200 to 250, were used and divided into control group (CS), untreated infarcted group (IC) and infarcted treated group (IP) Myocardial infarction was performed by ligation of the left coronary artery, the IP group piridosigmina and immediately treated with a dose of 40 mg / kg / day in the supplied water. On the fifth day, all animals underwent cannulation of the femoral artery for blood pressure (BP) recording the next day, thereby extracting the components of heart rate variability (HRV). On the seventh day the animals were killed specifically for the collection of tissue and measurement of cytokines by ELISA and immunohistochemistry achievement. The results of parametric behavior were analyzed by variance (ANOVA) of a road, while the results of non-parametric behavior were analyzed by Kruskal-Wallis test. **Result:** The diastolic blood pressure of IP group ( $83 \pm 0.3$  mmHg) was similar to the CS group ( $82 \pm 0.9$  mmHg), and was higher in the HF group ( $88 \pm 0.3$  mmHg). Greater vagal modulation in the IP group was observed when compared to the HF group, because there was an improvement in the low frequency (LF) component ( $14.7 \pm 1.0$  vs  $28.7 \pm 5.0$  nu) and in the high frequency (HF) componte ( $85.4 \pm 1,0$  un vs  $17.2 \pm 5.0$  nu) of heart rate variability. Moreover, the LF and HF values were similar between IP groups ( $16.8 \pm 3.0$  and  $83.2 \pm 3.0$  nu) and CS ( $14.7 \pm 1.0$  and  $85.4 \pm 1.0$  nu). The LF / HF ratio in the CS

group ( $0.2 \pm 0.05$ ) and IP ( $0.2 \pm 0.05$ ) were also similar, whereas in the HF group was high ( $0.4 \pm 0.09$ ). The concentration of the inflammatory pro-cytokine were higher in HF group compared to the group IP, IL-1 $\beta$  ( $81 \pm 29$  vs.  $21.8 \pm 29,5,6$  pg/ml), IL-6 ( $99 \pm 50$  vs  $26.6 \pm 22.4$  pg/ml) TNF- $\alpha$  ( $99 \pm 11$  vs.  $26.6 \pm 2.4$  pg/ml) and IL-10 ( $66 \pm 6.8$  vs  $43 \pm 3.0$  pg/ml), and the PI values were similar to the CS group. Immunohistochemical analysis demonstrated that macrophages (MO) M1 marked on the IP group showed a distribution pattern different in lesion area of the IC group, being more concentrated at the edge of the infarcted tissue. Moreover, MO M2 IP group were higher on the seventh day after MI compared to the IP. **Conclusion:** We observed that the administration of pyridostigmine anticholinesterase influences the mobilization of inflammatory cells in the infarcted area, reducing macrophage ratio M1 / M2, with significant reduction in concentrations of proinflammatory cytokines in cardiac tissue of rats, on the 7th day Pos IM.

Keyword: Myocardial infarction, inflammation, Neuroimmunomodulation, Cholinergic anti-inflammatory pathway, Wistar.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ativação das células T após lesão tecidual.....	6
Figura 2. Subpopulações de células T. ....	7
Figura 3. Modelo de resposta inflamatória após IM.....	11
Figura 4. Remodelamento do ventrículo esquerdo e da matriz extraceulular após infarto do Miocárdio (IM) .....	14
Figura 5. Vias anti-inflamatórias humorais, colinérgica e simpática. ....	17
Figura 6. Sequência experimental do estudo .....	22
Figura 7. Indução do infarto agudo do miocárdio por ligadura da artéria coronária. .	24
Figura 8. Sítio de dissecação para a cateterização da artéria femoral (A) e isolamento da artéria femoral e inserção do cateter (B) .....	25
Figura 9. Esquema do sistema de registro de Pressão Arterial.....	26
Figura 10. Método indireto de Imunohistoquímica pelo complexo Avidina-Biotina-Peroxidase. ....	29
Figura 11. Peso dos grupos analisados antes da eutanásia. ....	31
Figura 12. Frequência cardíaca dos grupos analisados.....	32
Figura 13. Pressão arterial diastólica dos grupos analisados.....	32
Figura 14. Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo – SDNN (Desvio padrão de todos os intervalos RR) dos grupos analisados .....	33
Figura 15. Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo – RMSSD (Raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes) dos grupos analisados. ....	33
Figura 16. Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência – LF (baixa frequência) dos grupos analisados.....	34
Figura 17. Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência – HF (alta frequência) da variabilidade da frequência cardíaca dos grupos analisados. ....	35
Figura 18. Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência – LF/HF (equilíbrio simpato-vagal) dos grupos analisados. ....	39
Figura 19. Concentração de IL-1 $\beta$ dos grupos analisados.....	36
Figura 20. Concentração de IL-6 dos grupos analisados. ....	37
Figura 21. Concentração de TNF- $\alpha$ dos grupos analisados.....	37
Figura 22. Concentração de IL-10 dos grupos analisados. ....	38
Figura 23a. Imunohistoquímica para marcação de células CD68, macrófagos M1...	39

Figura 23b. Box plot mostrando a distribuição das marcações entre os grupos, contadas em pixels.....	40
Figura 24. Imunohistoquímica para marcação de células CD68, macrófagos M1.....	39
Figura 25a. Imunohistoquímica para marcação de células CD 206, macrófagos M2. ....	41
Figura 25b. Box plot mostrando a distribuição das marcações entre os grupos, contadas em pixels.....	41
Figura 26a. Imunohistoquímica para marcação de células expressando Foxp3. ....	42
Figura 26b. Box plot mostrando a distribuição das marcações entre os grupos, contadas em pixels.....	43

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Valores representativos das variáveis hemodinâmicas dos grupos estudados.....	32
Tabela 2. Valores representativos da variabilidade da frequência cardíaca .....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS

- Ach - Acetilcolina
- Ag - Antígeno
- ATP - Adenosina trifosfato
- CAA - Célula apresentadora de antígenos
- C5a - Fragmento protéico liberado da clivagem da proteína C5 do sistema complemento
- CT - Célula T
- CAA - Célula apresentadora de antígeno
- CD - Cluster de diferenciação
- PMAD - Padrões moleculares associados a danos
- DC - Célula dendrítica
- FC - Frequência cardíaca
- Foxp3 - Fator nuclear de transcrição de proteína *Forkhead 3*
- HF - Alta frequência (do inglês *High Frequency*)
- ICAM - Molécula de adesão celular
- iNOS - Enzima óxido nítrico sintase induzível
- IL - Interleucina
- IM - Infarto do miocárdio
- IPEX - Desregulação imune, poliendocrinopatia, enteropatia ligada ao X
- LF - Baixa frequência (do inglês *Low Frequency*)
- MAC1 - Antígeno de macrófago 1 ou CD11b/CD18
- MØ - Macrófago
- MCP - Receptor da proteína quimiotática de monócitos
- M-CSF - Fator estimulador 4 de colônia de macrófago
- MEC - Matriz extracelular
- CMH- Complexo maior de histocompatibilidade
- mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro
- MO - Monócito
- nAChR  $\alpha$ -7 - Receptor de Acetilcolina  $\alpha$ -7 nicotínico
- NK - Natural Killer
- NOD - Receptor de domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos
- PAF - Fator estimular de plaquetas

PCR - Proteína C reativa

PIR- Brometo de piridostigmina

PRRs - Receptores de reconhecimento padrão

RAC - Reflexo anti-inflamatório colinérgico

RMSSD - Raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes

ROS - Espécies reativas ao oxigênio

RRV - Variância dos intervalos RR

SDNN - Desvio padrão de todos os intervalos RRSI - Sistema imunológico

TCR - Receptor de células T

TGF - Fator de transformação do crescimento

TLR - Receptores Toll-like

TNF - Fator de necrose tumoral

TR1 - Célula T reguladora CD4+ Foxp3 - tipo 1

VD - Ventrículo Direito

VE - Ventrículo esquerdo



## SUMÁRIO

1.	Introdução.....	2
1.1.	Sistema imune inato e adaptativo.....	4
1.2.	O processo inflamatório na cicatrização após IM .....	8
1.3.	O Remodelamento Ventricular e alterações físicas .....	12
1.4.	Modulação da resposta inflamatória pelo reflexo Colinérgico Anti-inflamatório 14	
1.5.	Modulação Inflamatória e remodelação cardíaca .....	19
2.	Justificativa .....	20
3.	Objetivos.....	21
3.1.	Geral.....	21
3.2.	Específicos .....	21
4.	Materiais e métodos .....	22
4.1.	Animais.....	22
4.2.	Sequência experimental .....	22
4.3.	Grupos.....	23
4.4.	Modelo experimental de infarto agudo do miocárdio .....	23
4.5.	Canulação .....	24
4.6.	Medida direta da pressão arterial .....	25
4.7.	Análise da variabilidade da frequência cardíaca espectral .....	26
4.8.	Coleta de tecidos e eutanásia do animal .....	27
4.9.	Preparo do tecido para realização de teste elisa .....	27
4.10.	Avaliação de macrófagos e linfócitos Tregs (Foxp3) na área infartada por meio da imuno-histoquímica.....	28
5.	Análise de dados .....	30
6.	Resultados.....	31
6.1.	Valores hemodinâmicos .....	31
6.2.	Citocinas.....	36
6.3.	Imunohistoquímica.....	38
7.	Discussão .....	48
8.	Conclusão.....	58
9.	Bibliografia.....	59

## 1) Introdução

As doenças cardíacas atualmente se apresentam como umas das principais causas de morte no mundo. As síndromes coronarianas agudas se caracterizam como um grupo variado de agravos cardiovasculares, dos quais se destaca o infarto do miocárdio (IM).<sup>1</sup> O IM apresenta elevado impacto social e devido à alta complexidade necessária ao seu adequado tratamento e elevada prevalência, essa condição clínica tem alta mortalidade. Além disso, o IM pode evoluir com disfunção ventricular de graus variados, o que reduz a qualidade de vida, leva à aposentadoria precoce, e traz prejuízos no âmbito familiar. No nosso meio, o IM é uma das principais causas da síndrome de insuficiência cardíaca congestiva.<sup>2-5</sup>

O termo IM se refere à lesão isquêmica originária de uma redução severa ou completa do aporte sanguíneo para os cardiomiócitos, provocando morte celular e alterações funcionais e estruturais na zona afetada, bem como no miocárdio remanescente. Seu prognóstico varia de acordo com a extensão e localização da área de necrose, e com a intensidade do processo de reparação da área afetada pelo infarto.<sup>6</sup>

A maioria dos casos de IM decorre da ruptura de uma placa aterosclerótica instável seguida da formação de um coágulo (trombo intracoronário) que oclui a luz da artéria coronária, levando à privação severa do fluxo sanguíneo para o miocárdio. A isquemia sustentada acarreta a morte celular, o que desencadeia um processo inflamatório, cuja intensidade depende de inúmeros fatores, incluindo o grau de lesão inicial.<sup>6</sup>

De acordo com a extensão do acometimento na parede muscular o IM pode se apresentar como um infarto subendocárdico ou transmural, sendo o segundo mais comum e mais grave.<sup>6</sup> A evolução da necrose isquêmica depende predominantemente da duração da isquemia, da intensidade, da circulação colateral e do estado prévio do miocárdio.<sup>7</sup> Uma isquemia cardíaca por menos de cinco minutos já é suficiente para causar anormalidades funcionais durante 48 horas no cardiomiócito, mas esta anormalidade é reversível,<sup>8</sup> e se apresenta com pouca ou nenhuma reação inflamatória.<sup>9</sup>

As alterações de origem isquêmica em cardiomiócitos de humanos são reversíveis, se o estímulo nocivo for retirado nos primeiros 15 a 20 minutos. A isquemia cardíaca prolongada leva a lesão grave e irreversível, sendo observadas assim alterações no metabolismo energético e na funcionalidade do miocárdio. As alterações responsáveis pela morte celular decorrem da redução do pH, que contribui para a autodigestão celular, da disfunção na geração de energia, por baixa eficiência do sistema glicolítico, e o rápido depreciação dos estoques de glicogênio. Simultaneamente há cessação da produção de adenosina trifosfato (ATP) que interrompe os mecanismos celulares dependentes de energia, como: (1) A bomba de sódio e potássio, levando ao aumento do influxo de  $\text{Na}^+$  e a saída de  $\text{K}^+$ , e entrada de água; (2) A bomba de cálcio, que leva ao aumento do influxo de  $\text{Ca}_2^+$  para o citosol, ativando enzimas auto-líticas. Cabe ressaltar que essas alterações nas bombas levam ao inchaço celular; (3) O retículo endoplasmático rugoso perde seus ribossomos pela tumescência celular, levando a perda de produção de proteínas. Conseqüentemente há o relaxamento miofibrilar com cessão de sua contratilidade, a ruptura do sarcolema e mitocôndrias com densidades amorfas se tornam bem visíveis. Todo este processo se dá ao longo de 04 horas após a isquemia. <sup>6</sup>

Compreender os processos celulares de lesão, de adaptação e reparação tecidual após o IM é essencial para determinar o prognóstico e desenvolver estratégias mais efetivas para a sua abordagem terapêutica. Sabe-se que a lesão isquêmica estimula as células a liberarem sinais que ativam o sistema imunológico, gerando um processo inflamatório complexo (com reações inflamatórias e anti-inflamatórias), na tentativa de reparar o tecido afetado. <sup>10</sup>

A substituição gradual do miocárdio irreversivelmente lesado por um tecido cicatricial depende da eficiência do sistema imunológico (SI) na limpeza dos detritos celulares da zona infartada. A eficiência do SI também interfere na qualidade da cicatriz, que por sua vez tem impacto na função e estrutura do miocárdio, que, posteriormente, influi na evolução clínica do paciente.

Portanto, a compreensão das diversas etapas e dos diferentes componentes desse orquestrado processo inflamatório tem potencial para desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

O SI é um sistema de defesa que compreende vários órgãos, diferentes tipos de células e moléculas que têm como funções a eliminação de patógenos, a prevenção de doenças malignas, a cicatrização e o envolvimento na rejeição de aloenxerto. O SI é didaticamente dividido em sistema imune inato e adaptativo.<sup>11</sup>

### **1.1) Sistema imune inato e adaptativo**

O SI inato é constituído de barreiras físicas, como células epiteliais, e fatores solúveis, como o sistema complemento, e representa a primeira linha de defesa contra os agentes patogênicos. O componente celular do SI inato compreende: células dendríticas (DCs), monócitos (MO), macrófagos (MØ), células Natural *Killer* (NK), neutrófilos, basófilos e eosinófilos. Estas células têm Receptores de Reconhecimento de Patógenos (RRPs) que são capazes de detectar moléculas provenientes de agentes patogênicos. Os RRP's incluem moléculas da família dos receptores tipo Toll [do inglês, Toll-Like Receptors (TLR)] e do tipo NOD (do inglês, Nucleotid binding Oligomerization Domain receptors). Com a lesão tecidual, estruturas denominadas Padrões Moleculares Associados a Danos (PMAD) são expostas na superfície das células e se ligam aos RRP's das células apresentadoras de antígenos (CAAs). As PMAD ativam as células para realizar a depuração dos detritos teciduais e promover a liberação de citocinas e fatores de crescimento envolvidos na orquestração da resposta reparadora. Os MO/ MØ e DCs têm funções de fagocitar e apresentar antígenos às células do SI adaptativo. Depois de realizar a fagocitose ou pinocitose, o Ag é degradado em lisossomos e em seguida seus fragmentos são expressos na superfície das CAAs acopladas em uma estrutura molecular denominada Complexo Maior de Histocompatibilidade (CHM) de classe I e II<sup>6</sup>. Esses complexos são apresentados às células do SI adaptativo. Outro mecanismo que aciona as células do SI se dá por meio da ativação da cascata do complemento.<sup>6</sup>

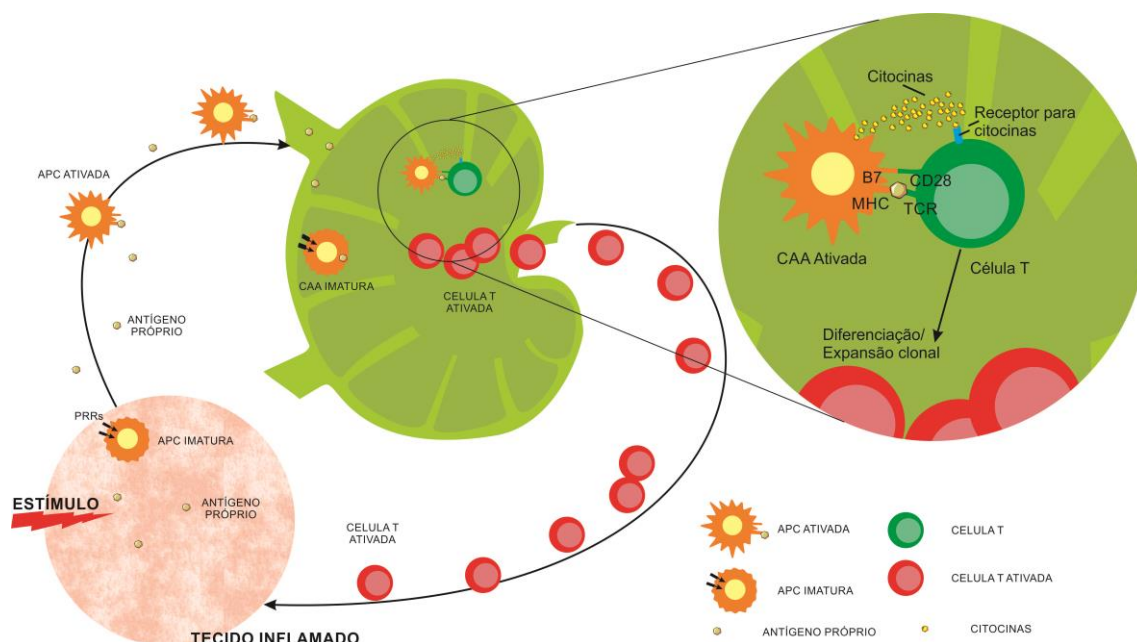
O SI adaptativo tem como componente humoral os anticorpos liberados por plasmócitos, e como componentes celulares as células T e B. Estes componentes se diferenciam do sistema imune inato por ter uma resposta mais lenta, específica e pela capacidade de produzir memória imunológica. As células

T e B possuem cada uma um único receptor de antígeno, o TCR (receptor de células T) e BCR (receptor de células B), respectivamente, e ao encontrar com seu antígeno cognato durante uma resposta imune tornam-se ativadas e multiplicam-se para assegurar uma resposta imune eficiente e altamente específica.<sup>12</sup>

As células T se originam de células tronco hematopoéticas (CTHs) na medula óssea. As CTH progenitoras linfóides se deslocam para o córtex do timo e se expandem, gerando uma grande população de células imunes imaturas. Estas células imaturas passam por fases de maturação para a expressão do TCR, e posteriormente ainda sofrem seleção natural para garantir sua funcionalidade.<sup>12</sup> As células que reconhecem o Complexo Maior de Histocompatibilidade (CMH) I se polarizam em linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos, ao passo que a seleção positiva para o CMH II resulta em linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares. Após a polarização em linfócito T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, estas células sofrem outra seleção para eliminar aquelas auto reativas.<sup>13,14</sup> Uma fração de células T desenvolve-se naturalmente em células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> e Foxp3<sup>+</sup>,<sup>15</sup> como mostra a FIGURA 1. Como será abordado mais adiante, essas células tem um papel fundamental como limitadoras ou reguladoras do processo inflamatório.

### **Interação entre SI inato e adaptativo: papel das células apresentadoras de antígeno na ativação das células T**

A ativação de células T ocorre nos órgãos linfóides secundários, tais como nos nódulos linfáticos. As células T migram para o órgão linfóide secundário por meio de vênulas ou pelos vasos linfáticos aferentes, e são ativadas pela interação do seu TCR com o CMH das CAAs. Contudo, outras moléculas co-estimuladoras são necessárias para esta ativação, como o receptor de superfície B7 das CAAs e a proteína de superfície CD28 de linfócitos T. Após a interação destes receptores, a liberação de citocinas pelas CAAs tem um papel decisivo na diferenciação das células T efetoras, conforme apresentado na FIGURA 2. As células T ativadas deixam o linfonodo via vasos linfáticos eferentes para os sítios inflamatórios onde exercem função efetora específica.<sup>16</sup>

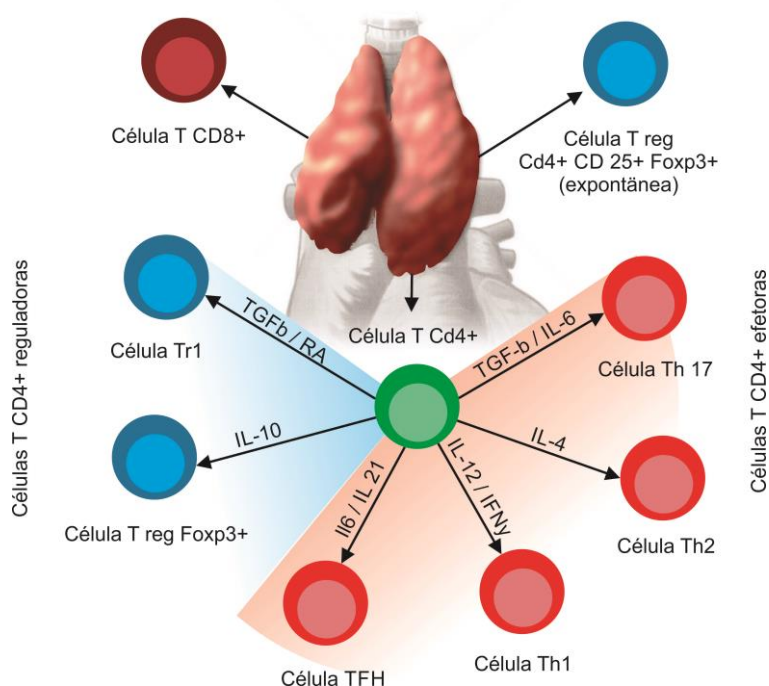


**Figura 1. Ativação das células T após lesão tecidual.** Na presença de antígeno, após estimulação dos PRRs por PMADs temos a ativação das CAAs (residentes no tecido afetado ou no linfonodo), desta maneira expressando maior quantidade de moléculas co-estimuladoras como o B7 e o complexo peptídeo-CMH em sua superfície, quando comparada a sua forma não ativada. As células T residentes no linfonodo reconhecem através de seu TCR o complexo peptídeo-CMH, associado a ligação da molécula CD 28 com a molécula B7 da CAA, e na presença de co-estimulação por citocinas levam a diferenciação e proliferação das células T. As células T CD 4<sup>+</sup> e T CD 8<sup>+</sup> convencionais liberam de maneira autócrina e parácrina a molécula IL-2 que promove a proliferação e diferenciação de células T. Conforme a prevalência de citocinas no meio e do estado de ativação das CAAs as células T CD 4<sup>+</sup> se diferenciam em subpopulações de células T. As células T ativadas migram para o sítio inflamatório para realizar sua função efetora específica. <sup>16-19</sup> Figura adaptada de Neefjes (2011), Girard (2012), Zhu (2010) e Bevan (2004)

Dependendo do tipo de RRP estimulado, as CAAs liberam diferentes citocinas, que determinarão em qual tipo de célula T CD4<sup>+</sup> efetora se diferenciarão, ou seja, a polarização das células T CD4<sup>+</sup> obedece preferencialmente a citocina secretada pela CAA (FIGURA2). <sup>17</sup> Além disso, cabe ressaltar que a CMH expressa na CAA também exerce grande influência. A CAA que apresenta o peptídeo CMH I estimula a diferenciação para células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas, que vão induzir a apoptose de células infectadas ou malignas, <sup>18,19</sup> enquanto as células T CD4<sup>+</sup> são ativadas por complexo peptídeo e CMH II.

Um subgrupo especial de linfócitos T são os denominados linfócitos T reguladores (Tregs). Os linfócitos Treg são células que suprimem a atividade imunológica, bloqueando a ativação e a função das células T efetoras citotóxicas. <sup>20</sup> Foram identificados como um subgrupo de células T CD4<sup>+</sup> supressivas que expressavam o receptor de cadeia  $\alpha$  da IL-2, denominado posteriormente de CD25. <sup>21</sup> As células Treg são originárias do Timo, pois evidências mostraram que

camundongos timectomizados evoluíram com doenças auto-imunes graves. Corroborando com este achado, ao se utilizar anticorpos monoclonais anti CD25, ou camundongos geneticamente modificados (Foxp3DRT) depletando de células Treg, observou-se o desenvolvimento de doenças auto-imunes sistêmicas de alta mortalidade.<sup>22</sup> Tais estudos demonstraram a importância fundamental das células Treg para proteção de resposta imunológica exacerbada ou mal direcionada.<sup>20</sup>



**Figura 2. Subpopulações de células T.** Célula T progenitora se diferencia no Timo em CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Na periferia as células T CD4<sup>+</sup> diferenciam após reconhecimento do antígeno em células efetoras ou reguladoras dependendo do citocina prevalente. Th1: célula T auxiliar 1; Th2: célula 2; Th17: célula 17; TFH: célula T auxiliar folicular; T reguladora Foxp3: célula T reguladora Foxp3; Tr1: célula T reguladora 1; T auxiliar TGF-β: fator de crescimento transformador beta; IL: Interleucina; RA: ácido retinóico.<sup>18,19</sup> Figura adaptada de zhu (2010) e Bevan (2004)

Cabe destacar que o fator nuclear de transcrição de proteína *Forkhead* 3 (Foxp3) é determinante para a função reguladora das células Treg<sup>22</sup>, sendo também seu principal marcador.<sup>23</sup> A importância funcional do Foxp3 foi observada em camundongos *scurfy* (que possuem proteína Foxp3 não funcional), que desenvolvem uma síndrome auto-imune grave e letal associada à inflamação de pele.<sup>24</sup> Em humanos o papel funcional da Foxp3 fica claro em

pacientes que apresentam a desregulação imune determinada pelo agravo poliendocrinopatia, uma enteropatia ligada ao X (IPEX). A IPEX está ligada a uma mutação genética, que atinge o locus associado à proteína Foxp3 de células Treg, gerando células Treg não funcionais, propiciando assim o aparecimento de doenças auto-imunes fatais em múltiplos órgãos.<sup>25,26</sup> Atualmente são conhecidos dois tipos de células Tregs: as células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> que são produzidas naturalmente no corpúsculo de Hassal no Timo e correspondem a 5-10% das células T CD4<sup>+</sup> periféricas; e as células Treg adaptativas geradas na periferia com funções de liberação de citocinas inibitórias como IL-10 e TGF- $\beta$ .<sup>21,23,27</sup> As células Treg adaptativas têm se mostrado eficientes imunossupressoras através de vários mecanismos.<sup>21,28</sup>

## 1.2) O processo inflamatório na cicatrização após IM

Após o IM, o reparo da área lesada é dividido em várias fases orquestradas pelo SI. Como já mencionado, a qualidade da cicatrização e a gravidade do remodelamento cardíaco, estão relacionadas principalmente a modulação da resposta inflamatória, com o envolvimento das várias classes de células mieloides e linfóides que mediam tanto as reações inflamatórias como as anti-inflamatórias.<sup>29-31</sup>

O SI inato é o primeiro a ser ativado através da via do complemento, provavelmente pela liberação de estruturas celulares das células lesadas como a mitocôndria, cardiolipina e fragmentos de membranas. A elevação de mRNA e proteínas da via do complemento na área infartada já está bem documentada.<sup>32</sup> Adicionalmente com a necrose celular, espécies reativas ao oxigênio (ROS) são extravasadas para o espaço extracelular e tem potencial lesivo para os cardiomiócitos e endotélio adjacentes, e também podem estimular a via inflamatória por ativação do complemento.<sup>33</sup>

A ativação da via do complemento apresenta função de quimiotaxia leucocitária, indução da expressão de P-selectina, aumento de substâncias quimiotáticas e aumento da capacidade endotelial de se ligar ao neutrófilo, devido ao aumento da expressão do receptor ICAM (molécula de adesão celular).<sup>34</sup>

A liberação de substâncias quimiotáticas na região do IM é fundamental não apenas para a migração de neutrófilos, mas também de outros componentes



celulares do sistema imunológico, envolvidos no processo de tentativa de reparação da área lesada. A sequência de liberação de substâncias quimiotáticas engloba: A liberação da proteína C5a do complemento, que é gerada no fluido intersticial e é acompanhada por sintetização de IL-8 por infiltrado de neutrófilos; o Fator Ativador de Plaquetas (PAF) que é um mediador fosfolipídico liberado por células endoteliais em resposta a trombina, que tem potente ação quimiotática para adesão endotelial de neutrófilos.<sup>35</sup>

Num modelo de isquemia/ reperfusão, foi observado nas primeiras 4 horas após reperfusão elevadas concentrações linfáticas de C5a. A concentração de C5a induz a expressão integrina antígeno de macrófago 1 (MAC1 – CD11b/CD18) em neutrófilo e ICAM-1 em cardiomiócitos, inclusive em áreas de tecido viável.<sup>36</sup> A molécula ICAM-1 pode estar envolvida na facilitação de migração de neutrófilos após reperfusão miocárdica, e citotoxicidade aderência dependente.<sup>8</sup> Ainda nas primeiras horas após IM, o TNF- $\alpha$ , derivado de mastócitos residentes teciduais, pode ser um fator importante para a maior expressão de IL-6 nos infiltrados celulares, e o início da cascata de citocinas responsável pela indução de ICAM-1 nos cardiomiócitos. A IL-6 pode induzir a ligação de neutrófilos a cardiomiócitos e ainda atuar como um depressor cardíaco dependente de óxido nítrico, no entanto, camundongos -/- IL-6 cursam com retardo na cicatrização tecidual cardíaca.<sup>8,38,39</sup>

Os neutrófilos, atraídos por fatores quimiotáticos, interagem com as moléculas de adesão endoteliais de vênulas pós-capilar, e saem dos vasos atingindo os tecidos (por diapedese) para liberar substâncias autacoídes. Estas substâncias, como os tromboxanos B2 e LTB4, induzem a vasoconstrição e agregação plaquetária. O acúmulo inicial de neutrófilos é um fator crítico para o controle das mudanças patofisiológicas, sendo eles atraídos para o sítio inflamatório pelas moléculas de IL-8, liberadas por células endoteliais.<sup>8</sup>

Apesar de serem importantes para a limpeza da área afetada, os neutrófilos apresentam uma citotoxicidade para os cardiomiócitos viáveis quando estão expressando MAC1. Esta molécula está mais expressa nos cardiomiócitos por estímulos das citocinas IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6.<sup>8</sup> Durante o IM as citocinas IL-1, TNF e IL-6 se apresentam mais elevadas, criando um ambiente propício para a ação citotóxica dos neutrófilos aos cardiomiócitos.

Os neutrófilos desempenham importante papel na resposta inflamatória do IM. Na fase aguda da lesão cardíaca os neutrófilos predominam, apresentando pico populacional no primeiro dia <sup>8,40</sup>, mas são superados em número por MO em 24 a 48 horas. A inibição dos neutrófilos pode reduzir o tamanho da lesão miocárdica, no entanto como contribuem para a limpeza da zona afetada, e se constituem em pré-requisito para a cicatrização adequada, <sup>8</sup> sua inibição pode obstar uma cicatriz de boa qualidade.

Os MO/MØ também são células chaves da homeostase imune e são fundamentais para a cicatrização das lesões após o IM. Quando estão no tecido os MO/MØ apresentam funções como fagocitose, apresentação de antígenos e reparação tecidual. <sup>40,41</sup> No IM ocorre elevação da concentração de MO circulantes e da produção destas células na medula óssea, e também ocorre redução do tempo de permanência destas células na circulação, uma vez que migram para o foco da lesão. Os MO são atraídos pela C5a nas primeiras horas após reperfusão, e rapidamente chegam ao local do infarto, infiltram-se por meio do receptor da proteína quimiotática de monócitos (MCP) -1, e alcançam o pico de concentração em 2-3 dias pós IM. <sup>42</sup> Os MO liberam mediadores inflamatórios, especialmente TNF- $\alpha$ , e proteases para degradação da matriz extracelular (MEC), contribuindo ainda para a fagocitose de detritos e aumento na reação inflamatória <sup>11</sup>.

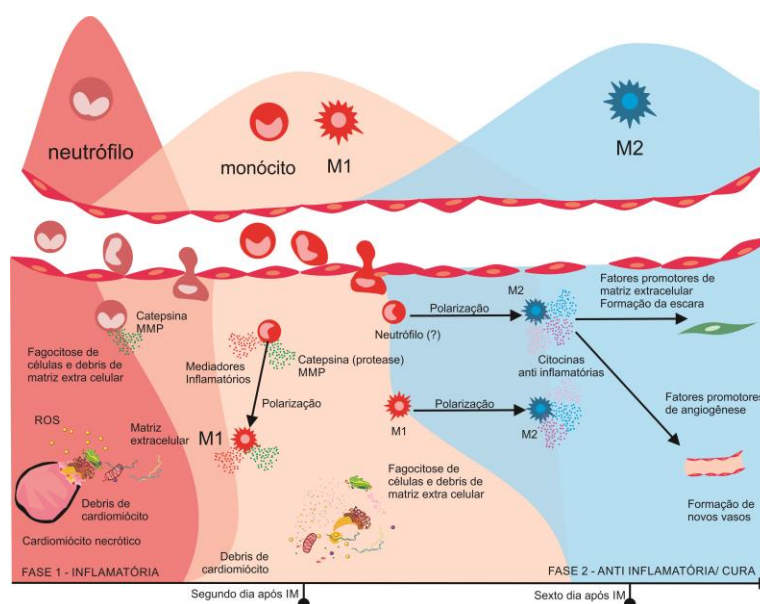
MO infiltrados no tecido isquêmico se maturam, estimulados pelo Fator Estimulador de Colônia de Macrófago (M-CSF) se diferencia em MØ. <sup>43</sup> Os MØ têm uma importante função no metabolismo da matriz extracelular, síntese de metaloproteinase e seus inibidores. <sup>44,45</sup>

A população de MO/MØ aumenta rapidamente após o início da isquemia e começa a encolher durante a resolução da inflamação, sendo que os MØ apresentam um novo pico populacional que caracteriza a fase de resolução. Apesar de sua meia vida curta, o recrutamento persistente e maciço mantém constante esta população celular. <sup>29,46</sup> Recentemente foi demonstrado que o baço produz e serve de reservatório para estas células, assim é responsável pela elevação aguda da população de MO/ MØ no processo inflamatório e manutenção destes no tecido acometido durante fases mais tardias <sup>46,47</sup>.

Ainda no que se refere aos MØ, sabe-se que estão agrupados em dois subconjuntos distintos de células: M1 (polarização clássica) e M2 (polarização

alternativa).<sup>48</sup> Experimento *in vitro* demonstrou que MØ derivados da medula óssea se diferenciam em M1 na presença de lipopolissacarídeo ou de IFN, tendo características pró-inflamatórias e liberam TNF- $\alpha$ , iNOS, IL-1 $\beta$  ou IL-6.<sup>49</sup> Contudo evidências mostram que as moléculas IL-4, IL-13, IL-10, TGF estimulam a diferenciação de MØ em células M2, que apresentam características anti-inflamatórias e liberam TGF, IL-10, entre outras.<sup>49,50</sup> No contexto do IM, *in vivo* os MØ M1 parecem substituídos sucessivamente por MØ M2, seguindo um padrão bifásico.<sup>52,53</sup>

Na FIGURA 3 estão destacados os processos de interação celular temporal destes três tipos celulares (neutrófilos, monócitos e macrófagos) no processo inflamatório do IM.



**Figura 3. Modelo de resposta inflamatória após IM.** Imediatamente ao IM observamos a infiltração massiva de neutrófilos, iniciando e amplificando a resposta inflamatória através de secreção de mediadores inflamatórios, promovendo a degradação da matriz extracelular por liberação de enzimas proteolíticas (catepsina e metaloproteinases). Há redução drástica do número de neutrófilos, e sua gradual substituição por monócitos, com pico aproximado no segundo dia. Os monócitos amplificam a inflamação através de liberação de mediadores inflamatórios e collagenases, grande maioria destes monócitos morrem por apoptose, entretanto parte se polariza em macrófago M1 que exerce função pró inflamatória. Num estágio mais tardio, os monócitos podem se polarizar em macrófagos M2, que exercem uma resposta anti inflamatória e promovem a cicatrização por secreção de mediadores como fator de crescimento endotelial (VEGF) e fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), entre outros mediadores, estimula a deposição de colágeno pelos miofibroblastos, levando a construção da cicatriz.<sup>29,54</sup> Figura adaptada de Nahrendorf M (2007) e Hilgendorf I (2014)

Modelos experimentais mais refinados demonstraram uma prevalência de MO tipo M1 na fase precoce de cicatrização,<sup>54</sup> posteriormente estes monócitos M1 se diferenciam em tipo M2 que secretam mediadores envolvidos

na resolução da inflamação. Estes MØ M2 com atividade anti-inflamatória têm grande capacidade de proliferação *in situ*.<sup>55</sup>

Cabe destacar que as células inflamatórias, além de degradar e retirar as células lesadas participa ativamente dos mecanismos de reparo tecidual, pois são capazes de regular a formação de novos vasos, a proliferação de fibroblasto e o metabolismo de matriz extracelular. Todo este processo é orquestrado por inúmeras citocinas e fatores de crescimento.<sup>56-61</sup>

Recentemente, foi publicada evidência inicial de que os linfócitos T pró-inflamatórios e linfócitos T anti-inflamatórios, como as células Tregs, têm um papel importante no processo de cicatrização após o infarto do miocárdio (IM).<sup>62</sup>

Além disso, estudos apontam que as células T podem apresentar citotoxicidade a cardiomiócitos saudáveis. Células T retiradas do baço de ratos submetidos ao IM apresentaram citotóxicidade para cardiomiócitos saudáveis, sendo a citotoxicidade e a atividade proliferativa destas células inibidas com a administração de anticorpos anti CD8<sup>+</sup>, de forma dose dependente.<sup>63</sup> Sabe-se que os linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> são ativados após a lesão isquêmica do coração, e que são detectados tanto na área infartada quanto no miocárdio remoto, sendo inclusive possível detectá-los a partir do sangue periférico e do baço, alguns dias após ligação da artéria coronária em ratos e camundongos.<sup>63,64</sup> Em humanos necropsiados, foi observada a presença de células T ativadas em zona peri-infarto e áreas não infartadas após extenso IM.<sup>65</sup> Esses dados indicam que a extensão da lesão cardíaca pode ser aumentada devido à citotoxicidade de células T.

Como citado anteriormente, as células Treg estão envolvidas na supressão da resposta imune aberrante ou excessiva. O papel protetor das células Treg contra o remodelamento ventricular adverso após o infarto do miocárdio foi recentemente investigado. O recrutamento insuficiente de células Treg resulta na piora remodelamento ventricular após IM. Além disso, o número de células Treg é reduzido e sua função está alterada em pacientes com insuficiência cardíaca crônica após IM.

### 1.3) O Remodelamento Ventricular e alterações físicas

O remodelamento ventricular representa a manifestação clínica de alterações progressivas no tamanho, forma e função cardíaca, oriundas das mudanças na expressão genética, alterações moleculares, celular e intersticial após a lesão. <sup>69</sup>

Após o IM, o desequilíbrio da síntese e da degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC) resulta em alterações que influenciam decisivamente a função cardíaca. Após insulto inicial, a área infartada do ventrículo esquerdo (VE) apresenta sinais de dilatação e afinamento, decorrentes de forças tensivas que geram distensões e deformações no tecido, provocando rupturas celulares. As rupturas elevam as concentrações de citocinas inflamatórias (IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) teciduais, prolongando o processo inflamatório. As citocinas aumentam a concentração de células inflamatórias, que liberam enzimas colagenolíticas, responsáveis por lesões secundárias ao tecido cardíaco por degradação da MEC. Ainda como consequência desta degradação da MEC, observa-se a perda da resistência do arcabouço de sustentação muscular, o que modifica a disposição dos cardiomiócitos, culmina no deslizamento e consequente realinhamento dos cardiomiócitos. Este realinhamento leva a redução da eficiência de contração do músculo cardíaco. Este evento é denominado expansão do infarto e sua ocorrência e magnitude estão ligadas ao tamanho da área infartada, e tem como principal manifestação clínica a hipertrofia ventricular excêntrica progressiva do coração. <sup>70</sup>

Logo a sobrecarga de tensão tecidual associada ao fenômeno da autoimunidade pode levar ao agravamento do remodelamento ventricular, como dito anteriormente estes processos elevam os níveis inflamatórios locais. <sup>70</sup> Quanto à autoimunidade, observamos a presença de diferentes tipos de anticorpos cardíacos contra tropomiosina e actina em pacientes infartados até 90 dias pós IM, inferindo que esta reação autoimune deve se relacionar com o aumento do dano miocárdico e o desarranjo da função cardíaca, entreando então uma relação entre o processo de remodelamento ventricular e SI adaptativo <sup>71</sup>. O remodelamento cardíaco e a cicatrização completa podem demorar cerca de um ano após IM, pois encontramos áreas de reparo tecidual em diferentes fases no tecido cardíaco. <sup>72</sup>



ventricular esquerda desfavorável que leva ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Neste cenário, a modulação do processo de cicatrização do miocárdio alvejando células do sistema imunológico pode ser um conceito terapêutico interessante para os pacientes após a lesão do miocárdio.

Recentemente, demonstrou-se que o sistema nervoso parassimpático modula a resposta inflamatória, agindo sobre as células efectoras relacionadas com a imunidade inata e adquirida, o denominado “Reflexo anti-inflamatório colinérgico”.

#### **1.4) Modulação da resposta inflamatória pelo Reflexo Colinérgico Anti-inflamatório**

Pesquisadores sugeriram a existência de uma relação da função autonômica e o processo de regulação imunológica ao observarem a queda na citotoxicidade do linfócito T pela estimulação colinérgica muscarínica.<sup>74</sup> Porém, apenas três décadas após este achado foi demonstrado, em ratos, que a administração de pequenas doses da droga CNI 1493 (potente agente anti-inflamatório que inativa macrófagos e inibe a síntese de mediadores inflamatórios), via intracerebroventricular, reduzia a resposta inflamatória induzida pela injeção de endotoxina. Essa resposta anti-inflamatória era abolida após a vagotomia ou bloqueio vagal com atropina.<sup>75</sup>

Além disso, foi observado que a estimulação elétrica do nervo vago em ratos, após injeção intravenosa de LPS (lipopolissacarídeo), era capaz de promover a mimetização do efeito inflamatório sistemicamente, com redução de níveis de citocinas inflamatórias no baço, fígado e sangue. Estudos posteriores demonstraram que o bloqueio periférico de receptores nicotínicos, por atropina, poderia reverter este efeito anti-inflamatório e ainda, que o bloqueio central de receptores muscarínicos também mimetizava este efeito.<sup>77-78</sup> Em humanos temos 16 tipos de subunidades de receptores nicotínicos para acetilcolina (ACh) que mediam os sinais do neurotransmissor acetilcolina nas junções neuromusculares, no sistema nervoso central e periférico<sup>79,80</sup>. Apesar de serem receptores inespecíficos, foi demonstrado que na via anti-inflamatória colinérgica (VAC) há a participação de receptores nicotínicos do tipo subunidade  $\alpha$ -7 (nACh  $\alpha$ -7), que é mais específico neste tipo de resposta que outras subunidades. Wang

e cols (2003) demonstraram em ratos  $\alpha$ -7 que o reflexo vagal era anulado e o mesmo acontecia com macrófagos  $\alpha$ -7, ambos expressando aumento na resposta inflamatória quando comparados aos controles.

Trabalhos desenvolvidos pelo grupo de Tracey KJ trouxeram informações que, em conjunto, formaram a base do conceito do “reflexo anti-inflamatório colinérgico” (RAC) (FIGURA 5). Esse arco reflexo é uma via de comunicação entre o sistema imunológico (via aferente) e o sistema nervoso central (via eferente, mediada pelo nervo vago), que modula a síntese de citocinas inflamatórias e ativação de células inflamatórias.<sup>75-78,81-83</sup> Na via aferente, a presença de Ag libera produtos inflamatórios que são detectadas pelos ramos sensitivos aferentes vagais que transmitem a informações para centros integradores no SNC central, desencadeando uma resposta reflexa. A via eferente do reflexo anti-inflamatório colinérgico que compreende além do vago motor, células do sistema imune e mediadores humorais atua modulando a inflamação e prevenindo assim danos secundários. O marcador químico mais comum para avaliar o efeito da estimulação vagal numa resposta inflamatória é o TNF- $\alpha$ .<sup>82,83</sup>

Diferentes grupos de pesquisadores como Tracey e cols,<sup>83,82</sup> Huston e cols<sup>84</sup> e Vida e cols<sup>85</sup> demonstraram que o baço dentro do reflexo anti-inflamatório colinérgico tanto é um sítio produtor de citocinas inflamatórias, quanto um local importante para a manutenção do reflexo anti-inflamatório. A partir dessas observações várias hipóteses surgiram na tentativa de compreender como ocorre a transmissão da informação do nervo vago para as células que produzem citocinas localizadas no baço. Contudo, ainda existem lacunas na compreensão desse importante tópico.



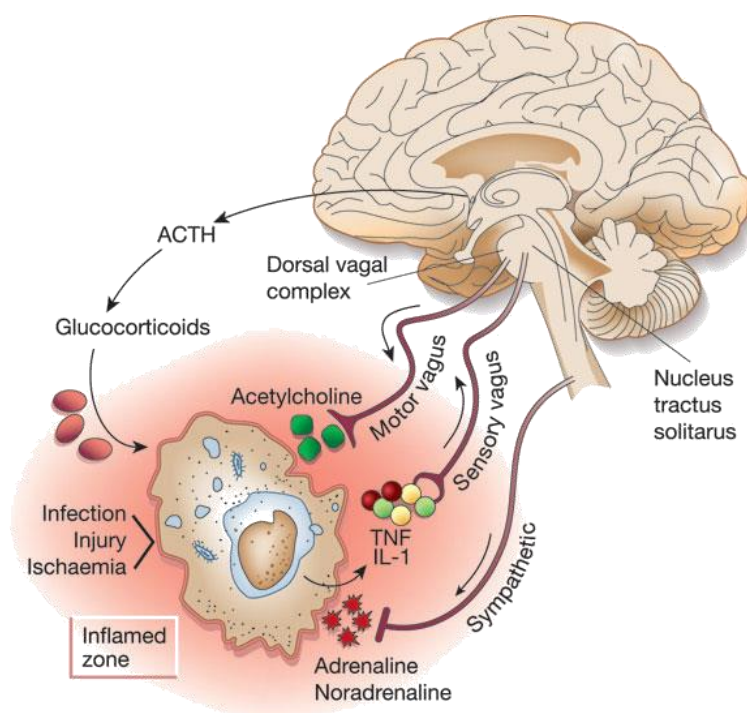


Figura 5. Vias anti-inflamatórias humorais, colinérgica e simpática<sup>83</sup>.

Inicialmente se aventou a possibilidade da inervação direta do nervo vago no baço. Contudo em roedores há pouca ou nenhuma inervação vagal no baço, apenas fibras noradrenergicas (simpáticas).<sup>84,85</sup> Gerou-se a partir deste fato a hipótese que as fibras pré-ganglionares parassimpáticas vagais faziam sinapse com neurônios pós-ganglionares simpáticos, e estes neurônios simpáticos pós-ganglionares formariam os nervos esplênicos. Esta teoria foi sustentada pela observação de que é necessário que haja inervação simpática esplênica para ocorrer o reflexo vagal,<sup>85-87</sup> e ainda porque os macrófagos esplênicos expressavam receptores nicotínicos e  $\beta$ -adrenérgicos, que *in vitro* respondem com redução na produção de TNF- $\alpha$ .<sup>76,81,88</sup> Contudo, foi demonstrado posteriormente que não há uma comunicação do nervo vago com o nervo esplênico, quebrando a hipótese anterior.<sup>89</sup> Através de evidências neuroanatômicas, foi demonstrado que a inervação do baço são de nervos simpáticos, oriundos de fibras das supra renais, ao invés de serem originários do gânglio celíaco. Foi sugerido recentemente um novo esquema para esta via anti-inflamatória: a presença de terminais nervosos simpáticos contendo noradrenalina no baço seria suficiente para a mediação deste reflexo, sem a necessidade de potenciais de ação dos nervos esplênicos.<sup>90</sup> Porém, se

desconhece qual o mecanismo que leva à estimulação direta das terminações nervosas adrenérgicas com liberação de noradrenalina, passo que antecede a produção de acetilcolina (Ach) e citocinas pelas células do baço.

No que se refere à Ach no RAC, evidências indicam que sua origem não era de terminações neurais e sim oriunda de um subconjunto de linfócitos T presentes no baço. Desta forma, é possível entender que a produção contínua de Ach, mesmo após algum tempo da cessão do estímulo elétrico do nervo vago, possa decorrer da ativação de um mecanismo “não neural” de comunicação entre o nervo vago e o baço.<sup>91,92</sup> Sabe-se que há grande migração de linfócitos circulantes para o baço em resposta a um estímulo inflamatório e esse influxo de linfócitos poderia estar envolvido nesta via não neural.<sup>93</sup> Sustentando esta teoria observa-se que anatomicamente o vago tem grande quantidade de projeções pós-ganglionares para o trato gastrointestinal, que é rico em tecido linfóide secundário.<sup>86,91</sup> A hipótese “não neural” infere que o estímulo elétrico do vago, percorre as fibras vagais aferentes que estimulam um ou mais depósitos de linfócitos de origem gastrointestinal e do timo e que são mobilizadas para o baço.<sup>94-96</sup> Muitos estudos ainda são necessários para compreender todos os passos desse complexo mecanismo de regulação reflexa.

### **A Modulação da Via Anti-Inflamatória Colinérgica com Piridostigmina**

O aumento da atividade vagal pode ser obtido por meio do uso de drogas. O brometo de piridostigmina é um composto amônico quaternário que inibe a hidrólise de acetilcolina pela ligação reversível com a acetilcolinesterase, permitindo então que o neuromediador conserve-se por mais tempo na fenda sináptica. É clinicamente utilizado no tratamento da Miastenia Gravis e na profilaxia contra a intoxicação por organofosforatos e vem sendo analisado como potencial fármaco no tratamento para doenças cardíacas.<sup>97,98</sup> Com relação às suas ações cardiovasculares existem evidências que a piridostigmina reduz a frequência cardíaca, aumenta a função diastólica ventricular e reduz a dispersão do intervalo QT em indivíduos normais.<sup>99-101</sup> Em estudo realizado pelo nosso grupo foi demonstrado que a administração de piridostigmina, em ratos Wistar

submetidos à isquemia miocárdica crônica e observados em três momentos (07, 21 e 42 dias), reduziu a área de acinesia (maior que 80%) verificada tanto pelo ecocardiograma, quanto pela histologia. Além disso, observou-se recuperação das funções sistólica e diastólica, com normalização da pressão diastólica final e das derivadas de contração e relaxamento. <sup>102</sup>

Em estudo experimental utilizando ratos Wistar infartados e tratados com piridostigmina cronicamente observou-se: aumento do tônus vagal, sem alterar a frequência intrínseca de marcapasso, a elevação da sensibilidade barorreflexa na taquicardia, a prevenção da remodelação cardíaca (por reduzir o acúmulo de colágeno) e melhora da função sistólica do ventrículo esquerdo após quatro semanas de tratamento. <sup>103</sup> Nosso laboratório já tem padronizada a dose efetiva desta droga administrada em água de beber (0,14 mg/ml, permitindo que os animais ingerissem 40mg/Kg/dia da droga). <sup>104</sup>

A modulação do sistema nervoso parassimpático pode ser mensurada quando se analisa a variabilidade da frequência cardíaca (VFC). O estudo CARDIA fez acompanhamento de 757 adultos jovens, por 15 anos, avaliando marcadores inflamatórios (PCR e IL -6) e atividade vagal, através da variabilidade do intervalo R-R. Análise univariável revelou que todos os índices de VFC foram fortemente e inversamente relacionados com os níveis de PCR e IL-6. Esses achados são consistentes com a hipótese de que a diminuição dos impulsos vagais anti-inflamatórios permite a elevação na produção de citocinas em humanos. <sup>105</sup> Em outro estudo foi demonstrado que a relação inversa entre IL-6 e SDNN (desvio padrão de todos os intervalos RR normais), frequência baixa e muita baixa de RRV (variância dos intervalos RR) em 24 h, em mulheres, 17 meses após IM ou revascularização do miocárdio. <sup>106</sup>

Com estes dados podemos inferir que a piridostigmina pode ser um potente fármaco para a estimulação vagal periférica, modulando a inflamação de forma mais eficaz.

## **1.5) Modulação Inflamatória e remodelação cardíaca**

Ensaio clínico em pacientes com IM com metilprednisolona (potente anti-inflamatório e imunossupressor) mostrou resultados catastróficos, com aumento da incidência de arritmias ventriculares e aumento da área de infarto.<sup>107</sup> Entretanto em outras doenças como Artrite Reumatóide, Doença Inflamatória Intestinal e uma lista crescente de outras síndromes inflamatórias crônicas as drogas que visando o bloqueio da liberação de citocinas inflamatórias (TNF, IL-1 e IL-6) estão demonstrando seus benefícios, contudo estes resultados não podem ser extravasados para paciente com insuficiência cardíaca crônica.<sup>108</sup>

A estimulação elétrica do nervo vago já se vem fazendo para o tratamento de epilepsia grave e depressão. Porém, esse tratamento visando estimulação da via eferente anti-inflamatória colinérgica está sendo indicado como uma importante opção terapêutica em pacientes portadores Insuficiência cardíaca crônica e artrite reumatóide visando a supressão de citocinas pro-inflamatória, possivelmente com recuperação funcional.<sup>109-112</sup>

Alguns agonistas seletivos do receptor de acetilcolina  $\alpha$ -7 nicotínicos (GTS-21 e outros) estão sendo pesquisados em alguns estudos pré-clínicos de doenças inflamatórias, isquemia de reperfusão em rim e intestino.<sup>78</sup> Novas informações sobre o perfil de segurança farmacológica dessas drogas já está sendo avaliada em humanos voluntários.<sup>96</sup>

Dessa forma a via anti-inflamatória colinérgica é um novo avanço terapêutico, visando à modulação da resposta inflamatória e controle na liberação de citocinas.

## **2) Justificativa e hipótese**

Potencialmente, o Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático é capaz de interferir na resposta inflamatória e no remodelamento ventricular, por meio de um efeito modulador em diferentes fases da resposta imune que se segue aos eventos coronarianos agudos. Testamos a hipótese de que o aumento da atividade parassimpática provoca alterações significativas na mobilização de macrófagos e linfócitos, em especial de células T reguladoras no miocárdio infartado, e também altera a concentração de citocinas no miocárdio. Os resultados podem ajudar a compreender o papel do reflexo colinérgica anti-

inflamatório sobre a remodelação miocárdica pós-infarto do miocárdio, e indicar novas intervenções terapêuticas em potencial.

### **3) Objetivo geral**

Avaliar os efeitos da estimulação parassimpática, por meio da administração do antagonista farmacológico da acetilcolinesterase (brometo de piridostigmina), sobre a resposta neuroimunomoduladora na fase subaguda do infarto do miocárdio experimental, em ratos.

#### **3.1) Objetivo específico**

Avaliar no 07º dia após infarto agudo do miocárdio, em ratos tratados com piridostigmina e sem tratamento, os parâmetros abaixo discriminados:

1. Parâmetros hemodinâmicos (pressão arterial e frequência cardíaca) e a variabilidade da frequência cardíaca
2. A concentração de IL-1 beta, IL-6 e TNF- $\alpha$  no tecido cardíaco, por meio da quantificação proteica pela técnica de ELISA.
3. A expressão de macrófagos (M1 e M2) e linfócitos (Tregs) no tecido cardíaco infartado e região peri-infarto, por meio da técnica de imunohistoquímica.

## 4) Materiais e métodos

### 4.1) Animais

Para realização deste estudo foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos adultos, com peso variando entre 200 e 250 g, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina do INCOR e mantidos no Biotério do setor de Experimentação, em condições sanitárias de biotério convencional, com controle de temperatura (22 a 24 C°) e controle de luminosidade (12h de claro e 12h de escuro).

Água e ração (Nuvilab da marca Nuvital, peletizada) foram oferecidas de modo irrestrito, sendo que a dieta ofertada era normoprotéica (12% de proteínas). O manejo dos animais obedeceu aos princípios éticos da experimentação animal da Sociedade Brasileira da Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA).

### 4.2) Sequência experimental

Os animais foram separados de forma aleatória em 03 grupos de 10 animais (01 grupo controle sham e 02 grupos infartados), para avaliação no 7° dia pós IAM, e seguiu-se o esquema mostrado abaixo:

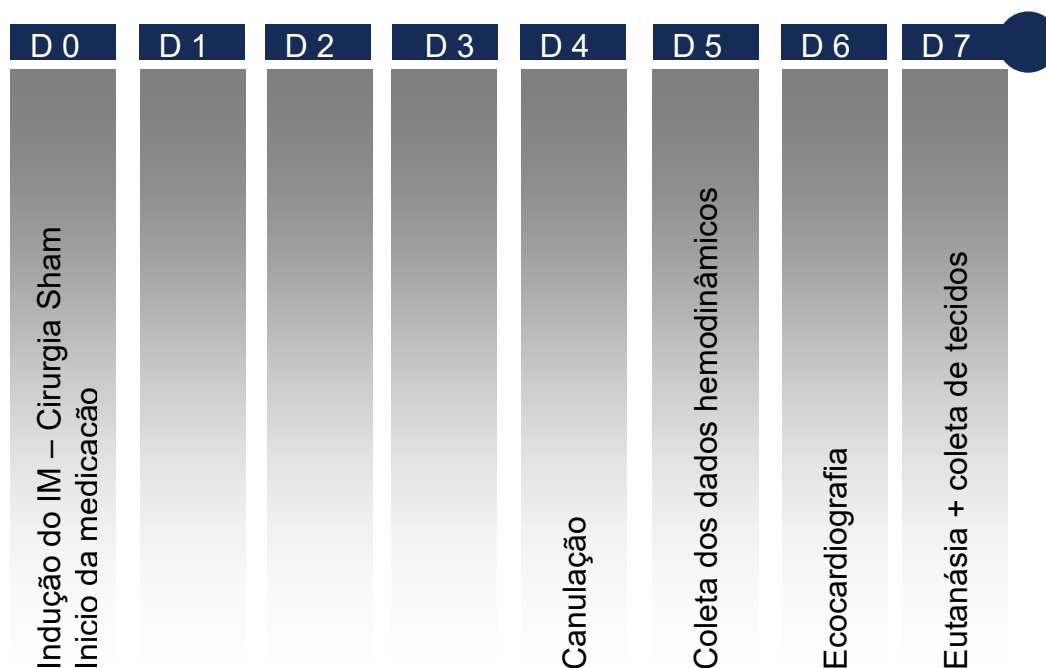


Figura 6. Sequência experimental do estudo

### **4.3) Grupos**

Grupo Controle sham(CS) – Foi realizada falsa cirurgia de oclusão da coronária esquerda no 0º dia de protocolo, sendo os animais acompanhados por 07 dias de protocolo (n=10).

Grupo Infartado (CI) – Foi realizada a oclusão da coronária esquerda no 0º dia de protocolo, sendo os animais acompanhados por 07 dias de protocolo (n=10).

Grupo Infartado/ Medicado com Piridostigmina (IP) –os animais foram medicados com Brometo de Piridostigmina logo após o infarto. O infarto foi realizado por oclusão da coronária esquerda no 0º dia de protocolo, por 07 dias (n=10). O tratamento com brometo de piridostigmina (Sigma) foi administrado aos animais na concentração de 0,2 mg/ml<sup>-1</sup> e na dose de 40 mg/Kg/dia, conforme protocolo prévio de nosso laboratório <sup>102</sup>.

### **4.4) Modelo experimental de infarto agudo do miocárdio**

Os animais foram pesados e anestesiados com uma mistura de Ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (12mg/kg) via intraperitoneal e colocados em decúbito dorsal e entubados (Gelko-14G), para a respiração artificial, realizada então a toracotomia em hemitórax esquerdo, na altura do quarto espaço intercostal, sendo colocado um afastador entre as costelas para permitir a melhor visualização. O pericárdio foi seccionado e o átrio esquerdo afastado para visualização da artéria coronária esquerda. Esta 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 benzilpenicilina benzatina (Penretard, Cibran, Tanquá, RJ, Brasil, i.m.) e colocados em ambiente aquecido para recuperação.

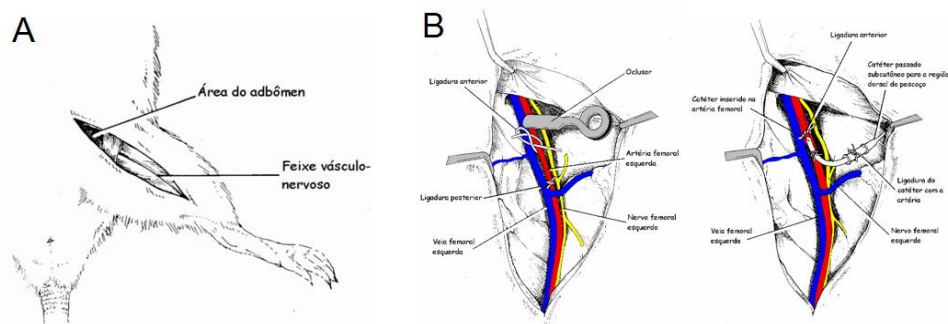




Figura 7. Indução do infarto agudo do miocárdio por ligadura da artéria coronária.

#### 4.5) Canulação

Os animais foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg) e mantidos em mesa cirúrgica aquecida (37° C), utilizado de procedimentos assépticos e lupa cirúrgica (*surgical microscope* – DFV – M90) para a colocação de cânulas de polietileno (PE-10, com diâmetro interno de 0,01 mm 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 a qual se conectou ao transdutor de pressão foi fechada com pinos de aço inoxidável. Através de uma pequena incisão na região inguinal esquerda em direção ao feixe vâsculo-nervoso femoral, as extremidades da cânula de menor calibre (PE-10) foram introduzidas na luz da artéria femoral (FIGURA 8). A cânula foi fixada com fio de algodão, na artéria e sua extremidade mais calibrosa foi passada subcutâneamente, 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. <sup>102</sup>



**Figura 8. Sítio de dissecação para a cateterização da artéria femoral (A) e isolamento da artéria femoral e inserção do cateter (B)**

#### 4.6) Medida direta da pressão arterial

Os registros de pressão pulsátil foram realizados com tempo de 60 minutos, dos quais foram aproveitados os 15 minutos mais estáveis, fornecendo valores diretos da pressão arterial em todos os grupos experimentais. A cânula arterial foi conectada a uma extensão de 20 cm (PE-50), permitindo livre movimentação do animal pela caixa, durante todo o período do experimento. (Kent Instruments, EUA) que, por sua vez, estava conectado 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, fornecendo os valores de pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) pela integral da área sob a curva no tempo. A frequência cardíaca 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 foram apresentados em valores médios e erros padrões dos períodos em que os dados foram analisados para PA e FC. <sup>102</sup>

#### 4.7) Análise da variabilidade da frequência cardíaca espectral

Os parâmetros para análise da VFC no domínio do tempo consistem em calcular os valores médios do intervalo de pulso. A variabilidade desta mesma variável foi quantificada pelo seu respectivo desvio padrão, além disso foi quantificado a raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacente (RMSSD) e o Desvio padrão de todos os intervalos RR normais gravados em um intervalo de tempo (SDNN).

Para a análise no domínio da frequência, foi realizada a análise espectral dos registros basais utilizando o método da Transformada Rápida de Fourier (FFT). 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 é estimado pela função de coerência. Valores de coerência (K) maior que 0.5 foram considerados significativos. <sup>102</sup>



Figura 9. Esquema do sistema de registro de Pressão Arterial

#### **4.8) Coleta de tecidos e eutanásia do animal.**

Utilizamos dois tipos de eutanásia, de acordo com a necessidade de coleta dos espécimes biológicos. Sendo os grupos subdivididos igualmente (n=05) para cada tipo de coleta.

Os subgrupos de animais direcionados ao estudo de citocinas do miocárdio foram submetidos à eutanásia por decapitação. O procedimento foi realizado por técnico capacitado, segundo princípios éticos da experimentação animal. Após decapitação, foi realizada a toracotomia, retirado o coração, e separado o ventrículo esquerdo, que foi colocado nitrogênio líquido para posterior preparo para quantificação proteica (ELISA).

Outros subgrupos de animais foram eutanasiados por meio de dose letal de anestésico e a seguir submetidos à perfusão do coração, para posterior análise de imunohistoquímica. Utilizamos clorpromazina (medicação pré-anestésica) na dose de 50 mg/kg (intramuscular), e em seguida administramos pentobarbital na dose de 50 a 80 mg/K. <sup>113</sup> O monitoramento constante do animal até a ausência de reflexos oculopalpebrais e sensitivos foi realizado para garantir a total anestesia dos animais, logo então foi realizada incisão abdominal transversal, para exposição dos órgãos e seção do átrio direito e canulação do ápice do ventrículo esquerdo para perfusão do animal. O coração foi parado em diástole pelo uso de solução com cloreto de potássio (14 mmol em solução fisiológica), perfundido com pressão constante de 80-90 mmHg por um período de 10 a 15 minutos. Após, este período foi perfundido com formol 4% tamponado por mais 10 a 15 minutos. Os tecidos foram deixados de 24 a 48 horas fixando em formol (4% tamponado), para processados (por desidratação, diafanização e parafinização do material) e posteriormente cortados em micrótomo (5 µm).

Após o experimento, os animais foram armazenados em sacos leitosos com identificação e refrigerados, para serem encaminhados posteriormente à incineração.

#### **4.9) Preparo do tecido para realização de teste ELISA**

A dosagem das citocinas IL-6, IL-1b e TNF- $\alpha$  foi realizada em tecido cardíaco retirado após decapitação. Foram coletadas amostras de ventrículo esquerdo da área localizada a cerca de 2mm abaixo da ligadura da coronária

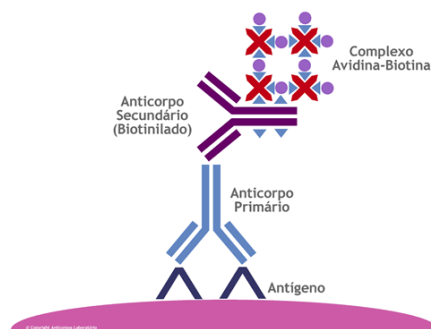
esquerda, porção mediana. As amostras foram acondicionadas em um eppendorf de 2 ml e imediatamente colocada em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer (aproximadamente - 70°C).

As proteínas do VE (100mg) foram extraídas em tampão (Tris base 100 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM; fluoreto de sódio 100 mM; pirofosfato de sódio 100 mM; ortovanadato de sódio 10 mM; aprotinina 10µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, PMSF 2 mM), incubadas com Triton X-100 - 10% por 30 minutos em gelo. Imediatamente, a amostra foi centrifugada a 13.000 rpm, 4°C, durante 20 minutos, e os sobrenadantes submetidos à quantificação proteica pelo método Bradford (Bradford, 1976) utilizando-se uma curva padrão de 50 a 1000 µg/ml de albumina bovina sérica e reagente de Bradford (coomassie brilliant blue 0,01%, etanol 47%, ácido fosfórico 8,5% e água destilada q.s.p); a absorbância foi determinada a 595nm.

A expressão das citocinas foi realizada por ELISA, foram usadas amostras do extrato de proteínas extraído do VE, incubadas com Kits Duo-set disponíveis para detecção de IL- 6e IL-1b (BD Systems Inc., Minneapolis, MN, EUA) e TNF-a (Pharmlngen, San Jose, CA, EUA). Os resultados foram normalizados pela proteína total do VE quantificada previamente.

#### **4.10) Avaliação de macrófagos e linfócitos Tregs (Foxp3) na área de infarto por meio da imunohistoquímica**

Para a imuno-histoquímica utilizamos anticorpos monoclonais com método indireto de detecção, através do complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC). A avidina tem a capacidade de se ligar a quatro moléculas de biotina, de forma não imunológica, a forte afinidade dá ao método uma excelente sensibilidade.



**Figura 10. Método indireto de Imunohistoquímica pelo complexo Avidina-Biotina-Peroxidase**(retirada do site <http://www.anticorpos.com.br/exames/imunohistoquimica.aspx>, acessado em 09/10/2014)

Para a desparafinização, as lâminas silanizadas foram deixadas na estufa de 60 a 65° C por 30 minutos, retiradas e imersas em xilol quente por 5 minutos, resfriadas com 03 banhos de xilol frio. A hidratação consistiu de banhos rápidos em recipientes cada um contendo álcool absoluto, álcool 90°C e álcool 70°C, lavando em seguida em água corrente e água destilada. Para a digestão ou recuperação antigênica consistiu de 15 minutos a 80°C em água morna, logo após imersão em solução de recuperação antigênica (Citrato pH 6), o bloqueio da peroxidase endógena foi realizada com imersão das laminas em água oxigenada de 20 volumes/ metanol por 10 minutos repetidos por 3 vezes, em seguida lavado sequencialmente em água corrente, água desliada e PBS ou TBS. O bloqueio da IgG inespecíficas foi realizado com albumina 5% por 15 minutos em temperatura ambiente.

Os anticorpos primários foram diluídos adequadamente e previamente titulados em tampão de diluição. As titulações utilizadas foram para CD68 1:500; CD206 1:800 e FoxP3 1:250. As lâminas foram secas ao redor dos cortes e colocadas em câmara úmida, e pipetadas os anticorpos individualmente e diluídos sobre os cortes, e incubados em câmara úmida em geladeira durante a noite. A seguir, foram lavadas com PBS ou TBS por 03 minutos, incubadas em câmara úmida com anticorpos secundários (Histofine – SAKURA) e deixadas por 30 minutos a 37°C, retirados e colocadas em TBS; após, foram mergulhadas em solução de cromógeno (Kit DAB Vector - DaKo), por 06 minutos, lavadas em água corrente por mais 10 minutos e contra coradas com hematoxilina de Harris

e lavadas em água. A montagem final consistiu em desidratar em banho de álcool absoluto e estufa, e cobrir com lamínula e resina sintética.

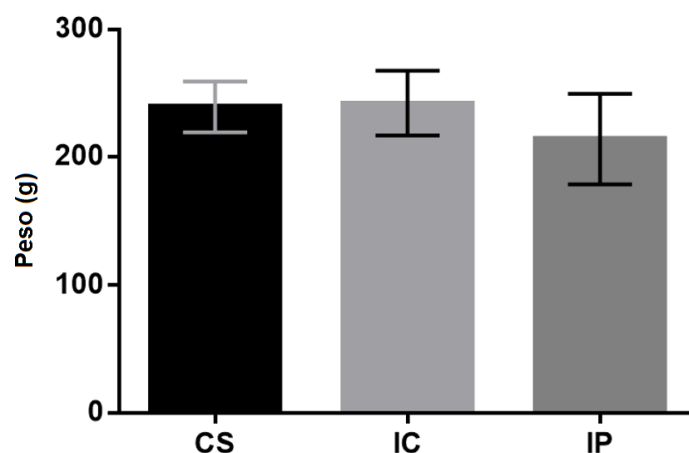
As análises foram realizadas em microscópio LEICA acoplado ao *software* LEICA Q WIN V3. Durante análise microscópica foram avaliadas as áreas infartadas (subendocárdica e intersticial). Destas áreas foram selecionados 10 campos por lâmina. Em cada campo, foram selecionadas as áreas de marcação específicas, e foi excluída a marcação inespecífica. Após esta seleção, foi realizada a quantificação da marcação pelo *software* específico programa de domínio público ImageJ<sup>®</sup> versão 1.48v 17.

## 5) Análise de dados

Os valores de cada parâmetro estudado foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão ou mediana  $\pm$  limites mínimo e máximo, após realização do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os dados não paramétricos foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis com teste post hoc de Student-Newman-Keuls, enquanto os dados paramétricos o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via com teste post hoc de Tukey, com o programa Programa GraphPad Prism, versão 6.00 para Windows, da GraphPad Software, San Diego. O valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado significativo.

## 6) Resultados

Foram incluídos 15 ratos machos Wistar, divididos em três grupos: grupo CS (n=5), grupo IC (n=5) e grupo IP (n=5). O peso médio final foi semelhante entre os grupos (CS  $239 \pm 20$  vs IC  $242 \pm 26$  vs IP  $214 \pm 36$  g), como demonstrado na FIGURA abaixo.



**Figura 11. Peso dos grupos avaliados antes da eutanásia dos grupos analisados.** CS = grupo controle sham; IC = grupo controle infartado; IP = grupo infartado tratado. ANOVA de uma via, com teste post hoc de Tukey

### 6.1) Valores hemodinâmicos

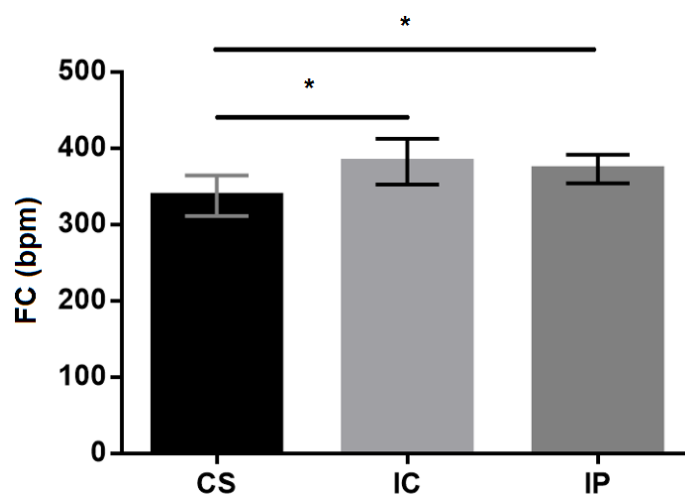
Não foram detectadas diferenças significativas entre os 3 grupos nos valores médios de PA sistólica e pressão média média. A FC dos grupos IC ( $382 \pm 13,4$  bpm) e IP ( $372 \pm 8,4$  bpm) foi significativamente elevada quando comparada a grupo CS ( $337 \pm 11,9$  bpm), como demonstrado na FIGURA 12. A pressão arterial diastólica se apresentou mais elevada no grupo IC ( $88 \pm 0,3$  mmHg) quanto comparado com o grupo CS, enquanto que a o grupo tratado ( $83 \pm 1,2$  mmHg) retornou a níveis pressóricos semelhantes ao grupo controle ( $82 \pm 0,9$  mmHg) (FIGURA 13).



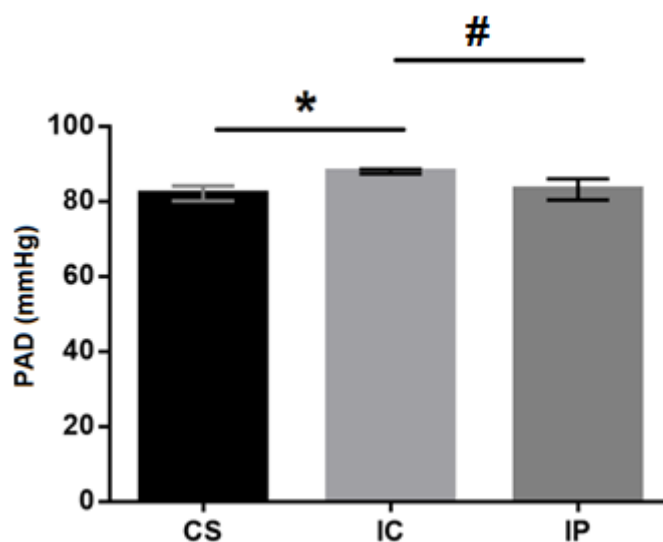
**Tabela 1. Valores representativos das variáveis hemodinâmicas dos grupos estudados**

	CS	IC	IP
Frequência Cardíaca (bpm)	337 ± 11,9	382 ± 13,4*	372 ± 8,4*
Pressão arterial Sistólica (mmHg)	121 ± 2,3	117 ± 1,6	114 ± 3,8
Pressão arterial Diastólica (mmHg)	82 ± 0,9*	88 ± 0,3*	83 ± 1,2#
Pressão arterial Média (mmHg)	100 ± 1,7	101 ± 0,7	97 ± 2,1

Dados representados por média ± erro padrão; CS = grupo controle sham; IC = grupo controle infartado; IP = grupo infartado tratado; # =  $p < 0,05$  vs IC; \* =  $p < 0,05$  vs CS. ANOVA de uma via, com teste post hoc de Tukey

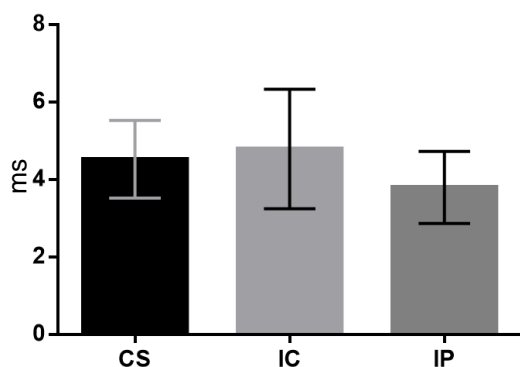


**Figura 12. Frequência cardíaca dos grupos analisados.** CS = grupo controle sham; IC = grupo controle infartado; IP = grupo infartado tratado; \* =  $p < 0,05$  vs CS; ANOVA de uma via, com teste post hoc de Tukey

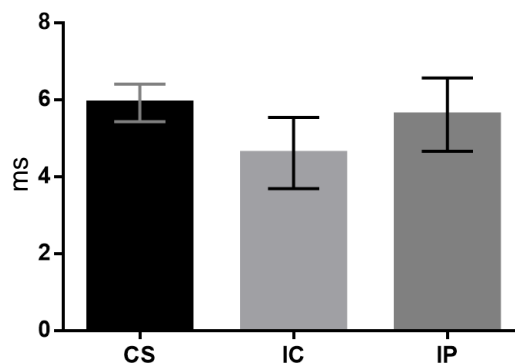


**Figura 13. Pressão arterial diastólica dos grupos analisados.** CS = grupo controle sham; IC = grupo controle infartado; IP = grupo infartado tratado; \* =  $p < 0,05$  vs IC; # =  $p < 0,05$  vs IP. ANOVA de uma via, com teste post hoc de Tukey

Considerando a análise da variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo, observamos que os valores de RMSSD (ms) e SDNN (ms) foram semelhantes entre os grupos. Tanto o parâmetro SDNN, que reflete de forma global a VFC, quanto o parâmetro RMSSD, considerado um componente vagal, não foram alterados de forma significativa com a dose de piridostigmina utilizada (FIGURAS 14 e 15).



**Figura 14. Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo – SDNN (Desvio padrão de todos os intervalos RR) dos grupos analisados.** CS = grupo controle sham; IC = grupo controle infartado; IP = grupo infartado tratado; grupos semelhantes; ANOVA de uma via, com teste post hoc de Tukey



**Figura 15. Variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo – RMSSD (Raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes) dos grupos analisados.** CS = grupo controle sham; IC = grupo controle infartado; IP = grupo infartado tratado; grupos semelhantes; ANOVA de uma via, com teste post hoc de Tukey

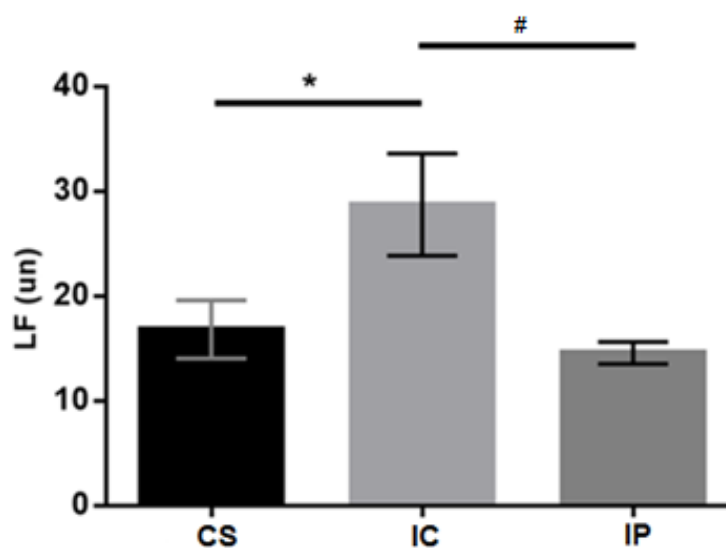
Contudo a análise da variabilidade no domínio da frequência foi diferente entre os grupos. O valor de baixa frequência absoluto (LF), importante indicador da modulação simpática se apresentou deslocado, favorecendo a atividade simpática no grupo IC ( $28,7 \pm 5,0$  un) ao ser comparado com os demais grupos, CS ( $16,8 \pm 3,0$  un) e IP ( $14,7 \pm 1,0$  un). Corroborando com este achado, observamos que o indicador de modulação da atividade parassimpática, alta frequência absoluta (HF), esta deslocado, favorecendo a atividade parassimpática no grupo IC ( $71,2 \pm 5,0$  un) quando comparado com os grupos CS ( $83,2 \pm 3,0$  un) e IP ( $85,4 \pm 1,0$  un) (FIGURA 17). Observamos então que nos parâmetros HF e LF importantes indicadores da função autonômica são semelhantes entre os grupos CS e IP, demonstrando efeito benéfico da piridostigmina na manutenção da modulação autonômica.

A relação LF/HF que reflete o equilíbrio simpático-vagal global. No grupo IC apresenta-se elevada no grupo IC ( $0,4 \pm 0,09$ ) quando comparada aos grupos CS ( $0,2 \pm 0,04$ ) e IP ( $0,2 \pm 0,01$ ). Podemos demonstrar o efeito do anticolinesterásico nos animais pela semelhança dos valores LF, HF e relação LF/HF do grupo IP quando comparado ao controle, demonstrando assim uma melhora na modulação autonômica (FIGURA 18).

**Tabela 2. Valores representativos da variabilidade da frequência cardíaca.**

	CS	IC	IP
RMSSD (ms)	$5,0 \pm 1,0$	$6,0 \pm 0,5$	$5,6 \pm 1,0$
SDNN (ms)	$4,5 \pm 0,2$	$4,8 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,5$
LF (un)	$16,8 \pm 3,0^*$	$28,7 \pm 5,0$	$14,7 \pm 1,0^*$
HF (un)	$83,2 \pm 3,0^*$	$71,2 \pm 5,0$	$85,4 \pm 1,0^*$
LF/HF	$0,2 \pm 0,04^*$	$0,4 \pm 0,09$	$0,2 \pm 0,01^*$

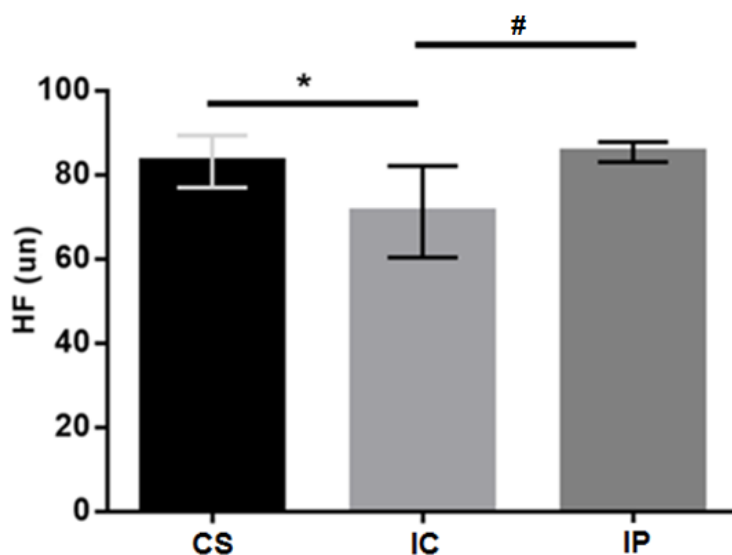
Dados representados por média  $\pm$  erro padrão. CS = grupo controle sham; IC = grupo controle infartado; IP = grupo infartado tratado; \* =  $p < 0,05$  vs IC; ANOVA de uma via com teste post hoc de Tukey



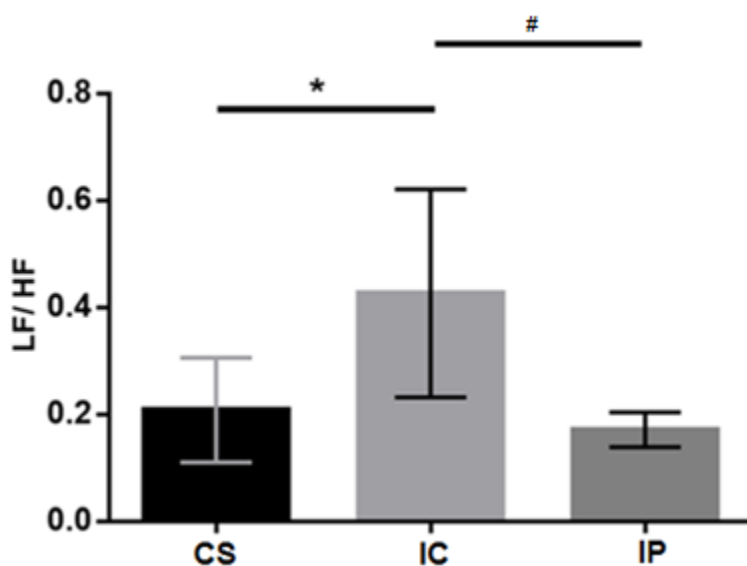
**Figura 167. Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência – LF (baixa frequência) dos grupos analisados.** CS = grupo controle sham; IC = grupo controle infartado; IP = grupo infartado tratado; \* =  $p < 0,05$  vs IC; # =  $p < 0,05$  vs IP. ANOVA de uma via, com teste post hoc de Tukey

Os dados acima sugerem que o IAM provoca alterações hemodinâmicas como aumento da frequência cardíaca e aumento da pressão arterial diastólica e dos parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca. Contudo o uso da

piridostigmina foi capaz de normalizar os componentes da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência e a pressão arterial diastólica.



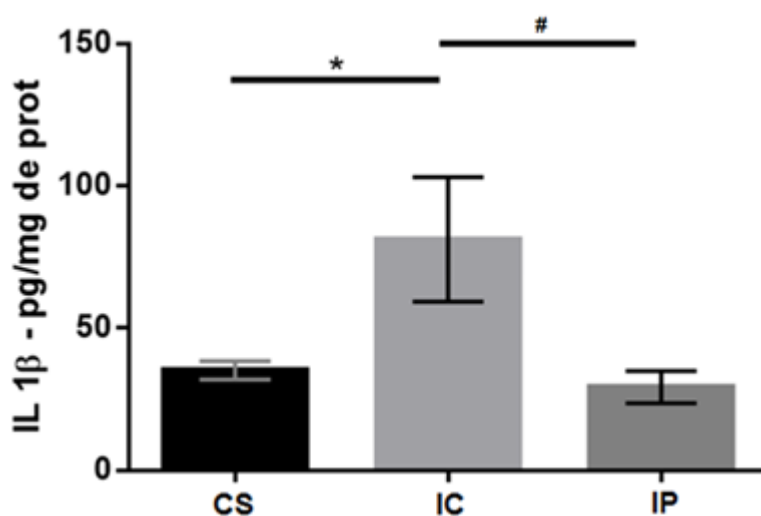
**Figura 17. Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência – HF (alta frequência) da variabilidade da frequência cardíaca dos grupos analisados.** CS = grupo controle sham; IC = grupo controle infartado; IP = grupo infartado tratado \* $p < 0,05$  vs IC; # =  $p < 0,05$  vs IP. ANOVA de uma via, com teste post hoc de Tukey



**Figura 18. Variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência – LF/HF (equilíbrio simpato-vagal) dos grupos analisados.** CS = grupo controle sham; IC = grupo controle infartado; IP = grupo infartado tratado; \* =  $p < 0,05$  vs IC; # =  $p < 0,05$  vs IP; ANOVA de uma via, com teste post hoc de Tukey.

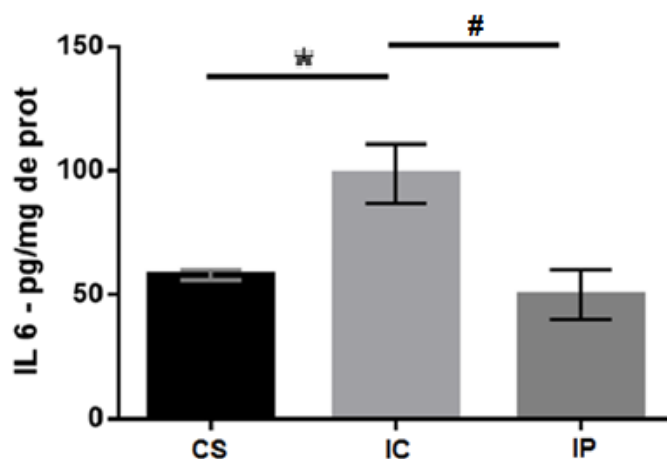
## 6.2) Citocinas

A IL-1 $\beta$  é uma das primeiras citocinas pró-inflamatórias produzidas após IM, sua concentração foi maior no grupo IC ( $81 \pm 21,8$  pg/mg de proteína) quando comparada ao grupo CS ( $35 \pm 3,2$  pg/mg de proteína) e IP ( $29 \pm 29,5$  pg/mg de proteína) (FIGURA 19).



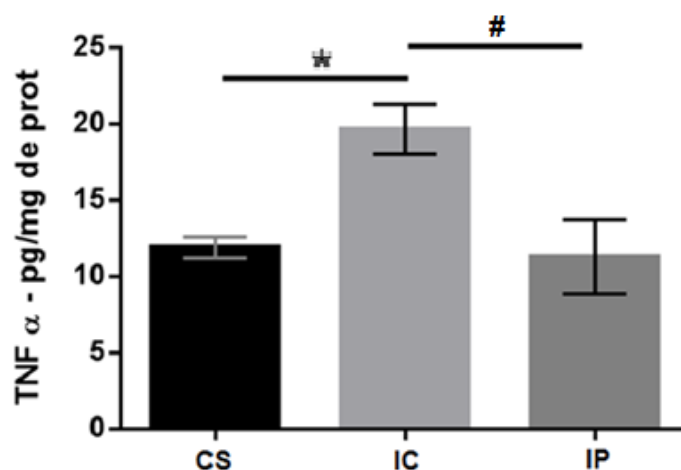
**Figura 19. Concentração de IL-1 $\beta$  dos grupos analisados.** CS = grupo controle sham; IC = grupo controle infartado; IP = grupo infartado tratado; \* =  $p < 0,05$  vs IC; # =  $p < 0,05$  vs IP; ANOVA de uma via, com teste post hoc de Tukey.

A IL-6 atua como uma citocina pró-inflamatória secretada principalmente por células T e macrófagos; de forma semelhante a IL-1 $\beta$  mostrou-se maior no grupo IC ( $99 \pm 26,6$  pg/mg de proteína) quando comparada aos grupos CS ( $58 \pm 4,6$  pg/mg de proteína) e grupo IP ( $50 \pm 22,4$  pg/mg de proteína) (Figura 20).



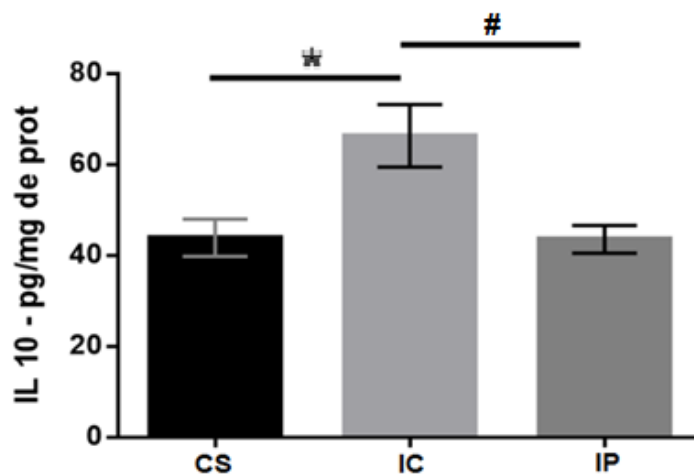
**Figura 20. Concentração de IL-6 dos grupos analisados.** CS = grupo controle sham; IC = grupo controle infartado; IP = grupo infartado tratado; \* =  $p < 0,05$  vs IC; # =  $p < 0,05$  vs IP; ANOVA de uma via, com teste post hoc de Tukey.

De forma semelhante, a concentração de TNF- $\alpha$  (citocina com característica pró-inflamatória, especialmente modulada pela via anti-inflamatória colinérgica) foi maior no grupo IC ( $99 \pm 26,6$  pg/mg de proteína) quando comparado ao grupo CS ( $12 \pm 0,6$  pg/mg de proteína) e grupo IP ( $11 \pm 2,4$  pg/mg de proteína) (Figura 21)



**Figura 21. Concentração de TNF- $\alpha$  dos grupos analisados.** CS = grupo controle sham; IC = grupo controle infartado; IP = grupo infartado tratado; \* =  $p < 0,05$  vs IC; # =  $p < 0,05$  vs IP; ANOVA de uma via, com teste post hoc de Tukey.

A concentração de IL-10, importante citocina anti-inflamatória, foi maior no grupo IC ( $66 \pm 6,8$  pg/mg de proteína) quando comparado ao grupo CS ( $43 \pm 4,1$  pg/mg de proteína) e grupo IP ( $43 \pm 3,0$  pg/mg de proteína) (FIGURA 22).



**Figura 22. Concentração de IL-10 dos grupos analisados.** CS = grupo controle sham; IC = grupo controle infartado; IP = grupo infartado tratado; \* =  $p < 0,05$  vs IC; # =  $p < 0,05$  vs IP; ANOVA de uma via, com teste post hoc de Tukey

As concentrações de citocinas no ventrículo esquerdo apresentaram valores semelhantes nas expressões IL-1 $\beta$ , IL6, TNF- $\alpha$  e IL-10 entre os grupos CS e IP no sétimo dia após infarto.

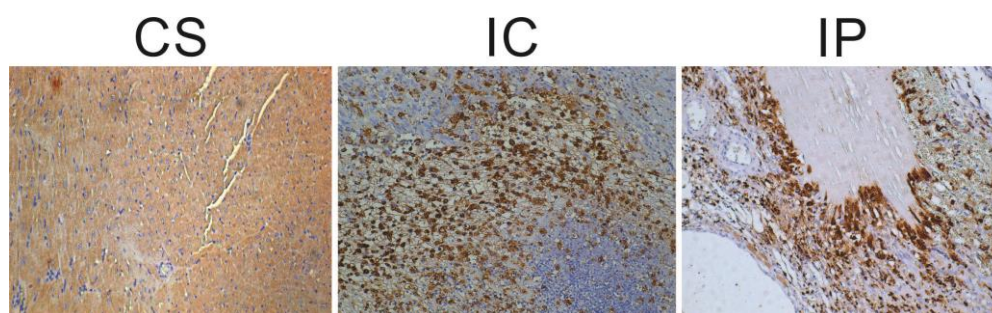
### 6.3) Imunohistoquímica

Como destacado anteriormente, foram incluídos 15 ratos machos wistar, com peso 200 a 250g, divididos em 3 grupos, grupo CS (n=05), grupo IC (n=05) e grupo IP (n=05). Para cada animal foram preparados cortes histológicos com a utilização de: Anticorpo monoclonal para CD68 (ab31630, 1/500, Abcam) para detecção de macrófago tipo M1; Anticorpo monoclonal para CD206 (ab64693, rabbit anti-mouse, 1/800, Abcam), para detecção de macrófago tipo M2; e Anticorpo monoclonal para FOXP3 (ab22610, 1/250, Abcam) para detecção de célula T reguladora (T reg).

#### Macrófagos tipo M1 (CD68<sup>+</sup>)

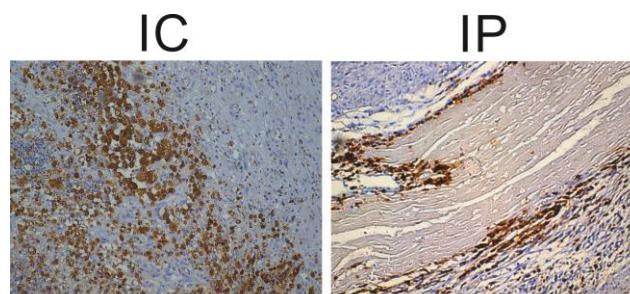
A marcação dos macrófagos tipo M1 (CD68<sup>+</sup>) foi realizada pelo programa de análise de imagens Image J<sup>®</sup> versão 1.48v 17 (free software, NIH, Bethesda,

Maryland, EUA) que quantificou em pixel as áreas castanhas, reveladas pela diaminobenzidina. Foi observado que ambos grupos infartados apresentaram quantidade aumentada de macrófagos tipo M1 na área peri-infarto (Figura 24a). A análise estatística revelou que existe uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e os grupos infartados (Kruskall-Wallis, post hoc Student-Neuman-Keuls  $p < 0,0001$ ), e que o tratamento com piridostigmina não influenciou a quantidade desses macrófagos com relação ao grupo infartado controle ( $p = 0,62$ ) (FIGURA 23b).



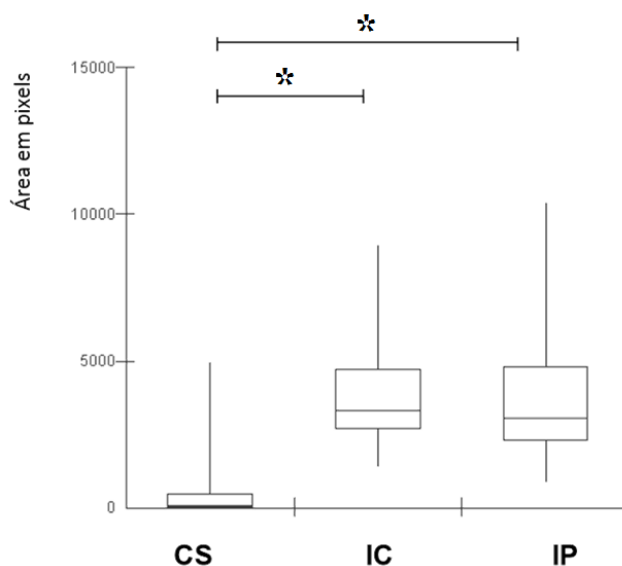
**Figura 23a. Imunohistoquímica para marcação de células CD68, macrófagos M1.** CS = grupo controle sham; IC = grupo controle infartado; IP = grupo infartado tratado. (Aumento 60x);

Ainda detectamos a presença de infiltrados celulares no tecido cardíaco do grupo sham (CS) foi pequena e de localização dispersa, sem padrão de distribuição detectável, enquanto que o padrão de distribuição de macrófago tipo M1 na área de lesão foi diferente entre os grupos infartados. Os macrófagos do tipo M1 estiveram espalhados em toda área de lesão no grupo IC, enquanto que no grupo IP estavam mais concentrados na borda do tecido infartado de macrófagos M1, no grupo tratado (IP) quanto comparado com o grupo infartado controle (IC) (FIGURA 24).



**Figura 24. Imunohistoquímica para marcação de células CD68, macrófagos M1.** Padrão observado de distribuição de infiltrado de macrófagos M1 em tecido cardíaco infartado (Aumento 60x),

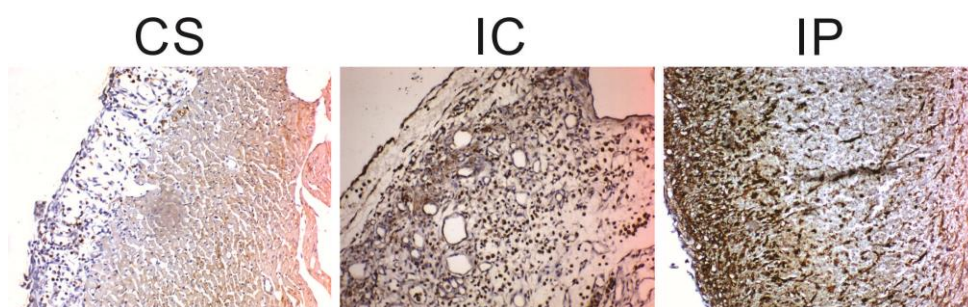




**Figura 23b. Box plot mostrando a distribuição das marcações entre os grupos, contadas em pixels.** Houve maior quantidade de macrófagos M1 nos grupos infartados com relação ao controle, ( $p < 0,0001$ ), mas não entre os infartados com e sem tratamento com piridostigmina ( $p = 0,62$ ). (Kruskall-Wallis, post hoc Student-Neuman-Keuls). C=controle, IC=controle infartado, IP= infartado que recebeu piridostigmina.

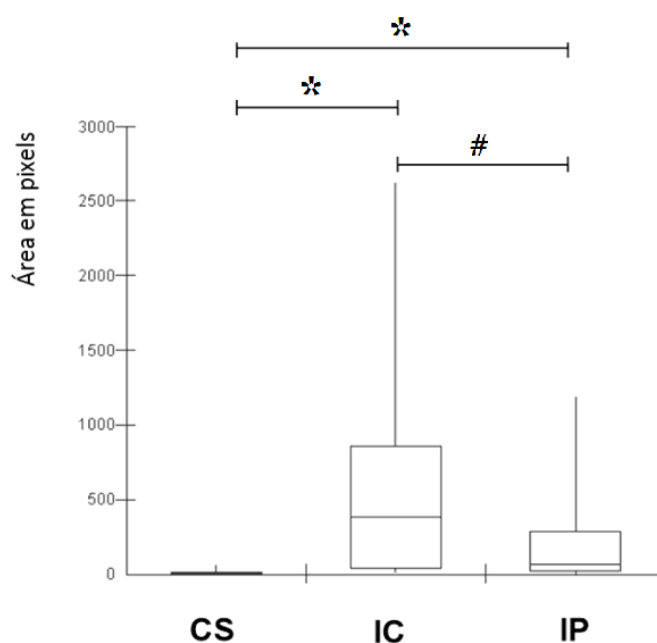
#### Macrófagos tipo M2 (CD206<sup>+</sup>)

A marcação dos macrófagos M2, observada pela presença do receptor de manose (CD206<sup>+</sup>) mostrou que todos os grupos possuíam macrófagos M2, no grupo controle em pequena quantidade, e nos animais infartados são dispersos na área do infarto e peri-infarto, mas em quantidades distintas (Figura 5). Os ratos infartados que receberam Piridostigmina apresentaram mais macrófagos do tipo M2 seguidos ratos infartados sem tratamento ( $p < 0,03$ ) e depois pelos do grupo controle (figura 26a), mostrando que o infarto *per se*, aumenta a quantidade de macrófago M2, responsáveis diretos pelo remodelamento e reparo tecidual. Todavia, o tratamento com piridostigmina aumentou a quantidade desses macrófagos com relação ao grupo infartado controle de modo estatisticamente significativo ( $p < 0,0001$ ) (FIGURA 25b).



**Figura 25a. Imunohistoquímica para marcação de células CD 206, macrófagos M2.** CS = grupo controle sham; IC = grupo controle infartado; IP = grupo infartado tratado (Aumento 60x).

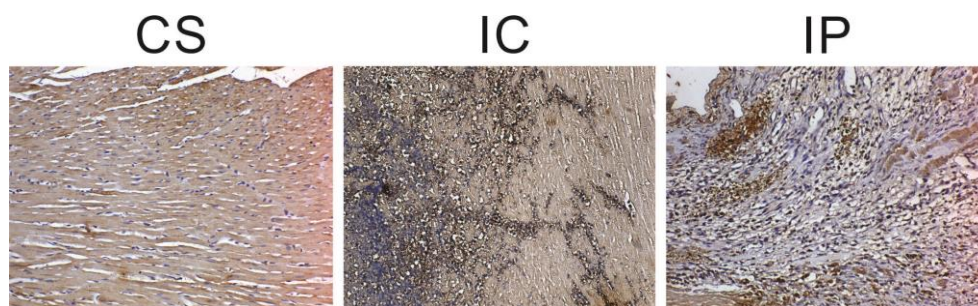
Observamos com estes dados, que ao final do sétimo dia após infarto, os animais tratados apresentaram uma relação dos tipos de macrófagos M1/M2 mais reduzida no grupo IP (8,02) quando comparado com o grupo não tratado CS (9,47), demonstrando a prevalência de uma característica anti-inflamatória.



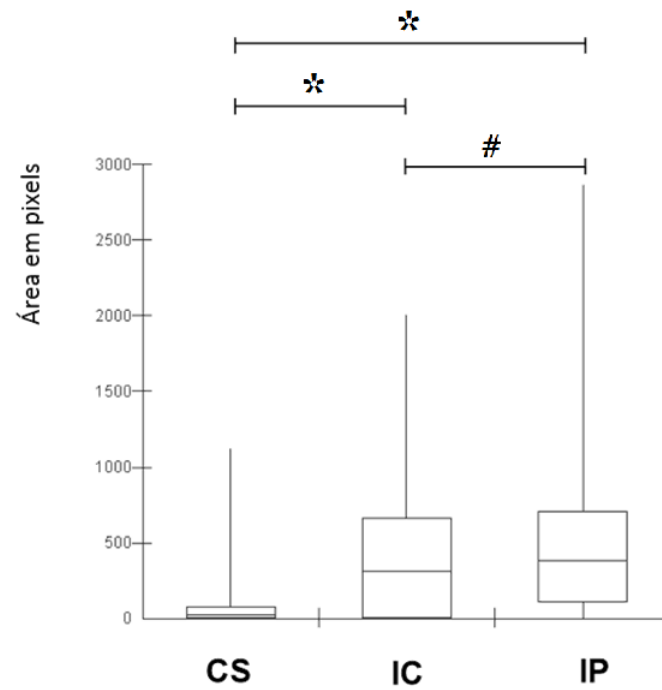
**Figura 25b: Box plot mostrando a distribuição das marcações entre os grupos, contadas em pixels.** Houve maior quantidade de macrófagos tipo M2 nos grupos infartados com relação aos demais ( $p < 0,0001$ ), seguido pelo grupo infartado sem tratamento ( $p = 0,0012$ ), e entre os grupos infartados entre si, mostrando que a piridostigmina aumentada quantidade de macrófagos tipo M2 na área infartada e peri-infarto ( $p = 0,03$ ) (Kruskall-Wallis, post hoc Student-Neuman-Keuls). C=controle, IC=controle infartado, IP= grupo infartado que recebeu piridostigmina.

## Linfócitos T reg (FoxP3<sup>+</sup>)

A marcação dos linfócitos T reguladores FoxP3<sup>+</sup> foi realizada da mesma forma que o anterior. Foi observado no grupo controle muito pouca marcação para linfócitos FoxP3<sup>+</sup>, enquanto que nos grupos infartados houve intensa marcação para linfócitos Tregs, que se apresentaram dispersos na área peri-infarto, em uma marcação ora presente na membrana celular, ora no citoplasma (Figura 26a). A análise estatística (Kruskall-Wallis, post hoc Student-Neuman-Keuls) revelou que existe uma diferença significativa entre todos os grupos, sendo que o grupo IC apresentou mais células, seguido pelo grupo IP e pelos animais do grupo controle (FIGURA 26b).



**Figura 26a. Imunohistoquímica para marcação de células expressando Foxp3.** CS = grupo controle sham; IC = grupo controle infartado; IP = grupo infartado tratado (Aumento 60x).



**Figura 26b: Box plot mostrando a distribuição das marcações entre os grupos, contadas em pixels.** Observou-se que o grupo IC apresentou mais linfócitos T reg FoxP3+, seguido pelo grupo IP e pelos animais do grupo controle. (Kruskall-Wallis, post hoc Student-Neuman-Keuls  $p = 0,006$ ). C=controle, IC=controle infartado, IP= infartado que recebeu piridostigmina.

## 7) Discussão

Como achados mais importantes do presente estudo destacamos: o efeito da dose administrada do anticolinesterásico piridostigmina na mobilização de células inflamatórias na área infartada, em especial, reduzindo a relação de macrófagos M1/M2, associada à significativa redução das concentrações de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) no VE de ratos, no 7º dia pós IM. Demonstramos ainda o efeito farmacológico da piridostigmina na modulação vagal, pela melhora em parâmetros da VFC no domínio da frequência.

Recentemente, observamos uma grande atenção na literatura para o papel da modulação vagal na redução da resposta inflamatória e na melhora do prognóstico em vários modelos experimentais de síndromes inflamatórias como: sepsis,<sup>114</sup> artrite reumatoide,<sup>111</sup> miocardite viral,<sup>115</sup> pancreatite,<sup>116</sup> choque hemorrágico,<sup>117</sup> doença de chagas,<sup>118</sup> lesão de isquemia/ reperfusão<sup>119</sup> e endotoxemia.<sup>120</sup> Estudos recentes também começaram a investigar a relação entre modulação vagal, modulação da resposta inflamatória e remodelamento cardíaco em modelos de infarto do miocárdio em diferentes espécies animais<sup>102,119</sup>. Os resultados foram promissores e levaram ao início de estudos sobre essa nova forma terapêutica em paciente com quadro de insuficiência cardíaca congestiva (ICC). A base teórica para indicação dessa terapêutica encontra-se no conceito que o Sistema Nervoso Autônomo (SNA), mais especificamente o parassimpático (Vago), pode reduzir o processo inflamatório crônico que caracteriza os portadores de ICC.<sup>121</sup>

Atualmente temos várias maneiras para aumentar a atividade vagal, incluindo a estimulação direta do nervo vago, como os implantes de eletrodos no nervo. O implante de dispositivo de estímulo vagal direto está bem documentado para o tratamento de epilepsia,<sup>109</sup> e como citado, mais recentemente está sendo estudado na insuficiência cardíaca,<sup>112</sup> e também em modelos animais de insuficiência mitral.<sup>122</sup> Apesar de concluírem que a estimulação direta do nervo vago seja segura, e com resultados positivos, estes dispositivos podem apresentar complicações associadas com o procedimento cirúrgico e com o seu funcionamento. Alternativas terapêuticas não invasivas estão ganhando atenção, e se mostram mais seguras e com melhor tolerância do paciente.

Dentre as alternativas terapêuticas não invasivas, que focam o aumento da atividade parassimpática, temos a estimulação elétrica transcutânea do vago e o uso de fármacos.

A PIR é um potente inibidor da acetilcolinesterase, sendo efetiva no aumento da modulação vagal, efeito já demonstrado em modelo experimental e humano.<sup>123</sup> Nosso grupo demonstrou não só a efetividade da elevação da função vagal com a administração deste fármaco, como também o aumento da sensibilidade baroreflexa, redução do balanço simpátovagal global (LF/HF) e melhora em parâmetros morfofuncionais em ratos infartados e tratados com a PIR,<sup>102</sup> na dose semelhante à utilizada em nosso estudo.

Efeitos benéficos deste fármaco sobre o sistema cardiovascular também foram demonstrados em vários estudos em humanos. Estudo investigando o efeito agudo da PIR em humanos adultos saudáveis, em que a concentração máxima da droga no organismo ocorreu em média em 150 minutos após administração, e, apesar da FC não se alterar, houve aumento do componente parassimpático da VFC (banda HF) foi observada após 5h.<sup>124</sup> Outras publicações descreveram que humanos saudáveis, medicados com a dose 45 mg de PIR tiveram menos alterações nos parâmetros hemodinâmicos durante o teste de estresse mental e aumento da VFC no exame de monitorização contínua da FC (HOLTER), quando comparados ao grupo controle. Estudo mostra que ao se administrar uma dose de PIR (45mg), em humanos com doença arterial coronariana estável, observaram-se, através de variáveis eletrocardiográficas, os efeitos cardioprotetores da PIR, como redução de arritmias ventriculares e redução do intervalo QTc. Os autores sugeriram que esses efeitos benéficos da PIR poderiam ter impacto na redução da mortalidade em pacientes com síndromes coronarianas. Além disso, os resultados demonstraram que a qualidade de vida poderia também ser melhorada, considerando-se que houve aumento da tolerância ao exercício em pacientes medicados com PIR.<sup>125</sup> Em todos estes estudos citados pouco ou nenhum efeito colateral foi referido, demonstrando sua segurança na administração em humanos em situações clínicas além da indicação clássica, para o tratamento da Miastenia Gravis.

Diversos estudos em modelos animais avaliaram os efeitos do aumento da modulação vagal (por estimulação elétrica do vago ou por administração da

PIR) na função ventricular e no remodelamento do coração. Em modelo experimental com ratos, a estimulação elétrica do nervo vago (ajustada para atingir um decréscimo de 20-30 batimentos cardíacos em relação ao momento basal) após 07 dias de IM, demonstrou-se após 6 semanas que a estimulação crônica vagal aumentou a sobrevida e preveniu a progressão da insuficiência cardíaca nos animais tratados.<sup>126</sup> Com relação ao aumento da modulação vagal por meio da administração de PIR, estudo em modelo experimental com ratos wistar machos com insuficiência cardíaca, avaliados na 6ª semana após ligadura coronariana e com administração de PYR (22 mg/kg/dia), foi capaz de melhorar o balanço autonômico e a sensibilidade quimiorreflexa, mas não se verificou melhora na função cardíaca, quando comparado ao grupo sham. Em camundongos com pequenas áreas de infartado, medicados com PIR (3mg/kg/dia) por minipumps subcutâneos em região interescapular por um período de quatro semanas após IM, não foram observadas diferenças no diâmetro do miocárdio e colágeno intersticial, no entanto o balanço autonômico foi restaurado.<sup>127,128</sup>

Estudo experimental com ratos Sprague-Dawley infartados, tratados com PIR numa dose semelhante ao do nosso estudo, por 14 dias, iniciando a sua administração após 7 dias de IM, observou-se melhora na função diastólica do VE acompanhada de redução da expressão de MMPs (metaloproteinases de matriz) na área lesada, que conferiu menor dano estrutural a matriz extracelular. Ainda no mesmo estudo, demonstrou-se que esse efeito benéfico se correlaciona com a redução da ativação da via TGF- $\beta$ 1/TAK1, via diretamente envolvida na hipertrofia e fibrose cardíacas.<sup>129</sup>

Ao utilizar o mesmo modelo de IM em ratos que o presente estudo, administrando uma dose de PIR 31 mg/kg/dia de piridostigmina por 14 dias, foi demonstrado que a PIR melhorou a reatividade vascular mediada por acetilcolina, por meio do aumento da disponibilidade de NO.<sup>130</sup> Vale ressaltar, no entanto, que os estudos citados não podem ser comparados de forma direta, considerando importantes diferenças no protocolo experimental utilizado, como espécies, dose de anticolinesterásico, início e término das avaliações, técnicas utilizadas. Porém, todos indicam efeito benéfico dessa classe de droga sobre o aparelho cardiovascular, fortalecendo a continuidade de estudos na área.

No presente estudo, a avaliação da função ventricular por meio da ecocardiografia foi realizada, porém os dados ainda não foram analisados. Todavia, estudos que utilizaram dose de PIR semelhante à usada neste estudo, apresentam mudanças em parâmetros funcionais e morfológicos no tecido cardíaco lesado, quando os animais foram avaliados semanas após o IM.

Em nosso trabalho, o tratamento com PIR não modificou os valores basais da pressão arterial sistólica (PAS), e da pressão arterial média (PAM) quando comparado com o grupo infartado sem tratamento. Todavia, a PAD que estava mais elevada no grupo infartado mostrou-se reduzida no grupo tratado com PIR. A FC nos animais infartados tratados ou não com PIR permaneceu elevada comparada ao grupo controle, e semelhante entre os grupos infartados. Esses dados indicam que o IM desloca a modulação autonômica do coração na direção da preponderância da atividade simpática e redução da atividade vagal cardíaca. A administração de PIR teve importante impacto na modulação simpato-vagal, com aumento significativo da modulação vagal e redução da modulação simpática. Esses dados vão de encontro aos resultados de vários estudos da literatura, que utilizaram doses de PIR semelhantes às nossas. Consideramos, portanto, que o tratamento com PIR foi eficaz na sua ação farmacológica primária.

Nosso estudo avaliou o efeito da PIR na modulação de células inflamatórias numa fase precoce da resposta inflamatória decorrente da oclusão mantida da coronária (IM). Como esperado, após IM houve um intenso infiltrado de macrófagos, que, no sétimo dia pós IM estava semelhante entre os grupos infartados, tratados ou não com PIR. Porém, no grupo tratado com PIR houve uma realocação dos macrófagos M1, que se aglomerou nas bordas da área infartada, ou seja, na zona peri-infarto. Com relação ao número de macrófagos M2 houve diferença numérica significativa entre os grupos. Ratos infartados apresentaram aumento dos macrófagos M2 comparado ao grupo controle. Porém, os ratos infartados que receberam PIR o aumento de macrófagos M2 foi ainda maior. Os mecanismos celulares (vias de sinalização) envolvidos nessa mudança de polarização dos macrófagos não foram avaliados nesse estudo, porém, necessitam ser posteriormente estudados. Contudo, podemos inferir que a administração de PIR está associada ao aumento da população de macrófagos



M2 na área infartada, no 7º dia pós IM. É interessante ressaltar ainda que a literatura indica que os macrófagos tipo M1 produzem citocinas pró-inflamatórias. Mas, no nosso estudo apesar do número de M1 estar semelhante nos grupos infartados, houve grande redução de várias citocinas pró-inflamatórias no grupo tratado com PIR. Esse fato sugere que a relação M1/M2 com predomínio anti-inflamatório tem papel importante na modulação de citocinas pró-inflamatórias pós IM.

Evidências na literatura demonstram que a estimulação da via anti-inflamatória colinérgica é capaz de modular a resposta inflamatória mediada por macrófagos. Em modelo experimental de pós-operatório simulando manipulação cirúrgica no intestino de ratos, demonstrou-se que a via anti-inflamatória colinérgica foi responsável pela redução da inflamação, após estimulação elétrica do nervo vago, e este benefício foi dependente do  $\alpha 7$ -nAChR. <sup>131</sup>

Outra possibilidade seria o efeito direto da acetilcolina nos macrófagos. Diversos estudos *in vitro* demonstraram a redução da liberação de citocinas inflamatórias por macrófagos em cultura após administração de acetilcolina e nicotina. <sup>75,76,81</sup> Em camundongos deficientes de apolipoproteína E (ApoE) que desenvolvem placas ateroscleróticas, tratados com AR-R17779, agonista seletivo do receptor nicotínico de acetilcolina  $\alpha$ -7 ( $\alpha$ -7nAChR), observou-se redução da área da placa aterosclerótica e aumento na sobrevivência dos animais. Adicionalmente, reduziu-se a expressão de citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$  e IL-6) e NOX2, bem como redução na pressão sanguínea e níveis lipídicos. Podemos sugerir que a maior disponibilidade de ACh, decorrente da administração de PIR, estimule os macrófagos por meio dos receptores de nicotina e dessa forma, reduza a produção de citocinas pró-inflamatórias. <sup>132</sup>

Em modelo experimental de isquemia e reperfusão em ratos, realizaram estimulação elétrica direta do nervo vago em dois momentos, 5 minutos antes e 5 minutos após isquemia, observou-se que após 24 horas houve redução da área infartada e menor número de apoptoses de cardiomiócitos. Nesse estudo demonstrou-se ainda que na área que sofreu isquemia houve redução da infiltração de macrófagos e de células polimorfonucleares, com menor expressão de citocinas inflamatórias e MCP-1, responsáveis pela mobilização de neutrófilos e macrófagos, respectivamente. Os macrófagos infiltrados no tecido cardíaco

expressavam imunoreatividade ao receptor nicotínico de acetilcolina  $\alpha$ -7 ( $\alpha$ -7nAChR).<sup>133</sup> Estes dados demonstram o envolvimento da via anti-inflamatória colinérgica, e seu efeito protetor, sobre o tecido cardíaco de ratos após isquemia/reperfusão.

Como apresentado anteriormente, os MO são atraídos pela presença de um fator da cascata do complemento (C5a) nas primeiras horas após a injúria do tecido, e infiltram-se local do infarto por meio do receptor da proteína quimiotática.<sup>22</sup> Os MO liberam mediadores inflamatórios, especialmente TNF- $\alpha$  e proteases para degradação da matriz extracelular (MCE), contribuindo ainda para a fagocitose de detritos e aumento na reação inflamatória.<sup>7</sup> MO infiltrados no tecido isquêmico se maturam, estimulados pelo Fator Estimulador de Colônia de Macrófago (M-CSF), em M $\emptyset$ .<sup>23</sup> Os M $\emptyset$  têm importantes funções na resposta inflamatória, no metabolismo da matriz extracelular, na síntese de metaloproteinase e seus inibidores, na coordenação da resposta imune adaptativa, na resolução e no reparo dos tecidos.<sup>24,25,134</sup> Diferentemente do estado não ativado, em que o macrófago pode sobreviver meses no tecido, durante o processo inflamatório há baixa sobrevivência de macrófago em tecido lesado. Contudo, na resposta inflamatória o número de M $\emptyset$  na área inflamada parece ser estável, devido à elevada taxa de deslocamento de novas células do baço, da medula óssea e proliferação local<sup>46</sup>, mantendo assim uma taxa populacional.<sup>25</sup> Através de seus receptores os M $\emptyset$  reconhecem “sinais de perigo” que os polarizam em diferentes fenótipos. Desta forma, dependendo do meio, pode ocorrer a indução de um estado de ativação clássico, denominado M1, ou uma ativação alternativa, denominada M2.<sup>134, 135</sup> O M $\emptyset$  M1 se caracteriza pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, enquanto que os M $\emptyset$  M2 apresentam características anti-inflamatórias.<sup>135</sup>

O pico da populacional de macrófagos M1 no tecido lesado ocorre ao redor da 1-3 dias, semelhante à população de neutrófilos, com decréscimo já no quinto dia, dependendo das características da lesão.<sup>133,132</sup> A população de macrófagos M1 representa cerca de 70% da população de macrófagos envolvida.<sup>53,133,136</sup> A resposta tardia se inicia gradualmente no quinto dia, com aumento gradual dos macrófagos M2, marcando assim a fase reparativa.

Experimento *in vitro* demonstrou que MØ derivados da medula óssea se diferenciam em M1 na presença de lipopolissacarídeo ou de IFN, tendo características pró-inflamatórias<sup>49</sup> e liberam TNF- $\alpha$ , iNOS, IL-1 $\beta$  ou IL-6. Por outro lado, moléculas IL-4, IL-13, IL-10, TGF estimulam a diferenciação de MØ em células M2, que apresentam características anti-inflamatórias e liberam TGF, IL-10, entre outras.<sup>27</sup> No contexto do IM *in vivo* os MØ M1 parecem ser substituídos sucessivamente por MØ M2, seguindo um padrão bifásico.<sup>28-30</sup> Os MØ M2 com atividade anti-inflamatória tem grande capacidade de proliferação *in situ*.<sup>31</sup>

Em nosso estudo apesar de termos observado maior concentração de MØ M2, esse aumento não foi acompanhado de aumento de IL-10. Esse fato parece paradoxal, e necessita maiores investigações.

A menor produção de citocinas no grupo de ratos tratados com PIR foi observada no nosso estudo, somente no ventrículo esquerdo. Não avaliamos citocinas no sangue periférico. Estudos clínicos recentes fizeram correlações entre modulação simpato-vagal e produção de citocinas. O estudo CARDIA verificou que a correlação positiva entre níveis séricos de mediadores pró-inflamatórios e atividade simpática em jovens saudáveis.<sup>105</sup> Corroborando com estes dados, foi demonstrado em humanos que há correlação inversa VFC com níveis de citocinas séricas: IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , contudo não apresentou relação direta com IL-10.<sup>138</sup>

Dois estímulos distintos (por IFN ou IL-4) que induzem a polarização dos macrófagos do Tipo 1 para o Tipo 2 são liberados por diferentes linfócitos (Th-1 e Th2). Esse fato demonstra a importância do SI adaptativo nos mecanismos de reparo pós IM, mais especificamente pela ativação de linfócitos T.<sup>139,140</sup>

O envolvimento das subpopulações de células T após IM está bem documentado na literatura. A compreensão da relação destas células com a ativação da via anti-inflamatória colinérgica ainda é escassa na literatura, e nossos resultados corroboram para ampliar o entendimento desta relação.

Já está bem comprovado o aumento de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no miocárdio infartado, sendo que há um predomínio das células T CD4<sup>+</sup>. Em modelo experimental, com camundongos infartados, foi evidenciado o papel

protetor dos linfócitos CD4<sup>+</sup>, já na primeira semana pós IM, pois camundongos knockout para essas células (CD4 KO<sup>-/-</sup>) apresentaram maior ruptura cardíaca e conseqüentemente maior mortalidade pós IM. Os animais que sobreviviam à fase aguda apresentavam após 56 dias aumento da área de infarto e maior dilataçãoidade do VE. <sup>141</sup>

Adicionalmente, no IM as células CD8<sup>+</sup> (citotóxicas) têm a capacidade de reconhecer e destruir cardiomiócitos viáveis *in vivo*. Esta reação inflamatória ultrapassa a função fisiológica necessária para remover o tecido necrosado. Postula-se que a magnitude da “inflamação patológica” é responsável pela extensão do infarto, e é mediada por células T1. <sup>139,142</sup>

Cabe destacar, que os linfócitos T regulatórios (Tregs) exercem um papel central na supressão de respostas imunes, regulando o comportamento e a expressão de genes em células T efetoras, macrófagos e células dentríticas, e estão, portanto envolvidas na auto-tolerância e supressão de respostas imunes exacerbadas. <sup>143,145</sup>

Estudo com camundongos infartados por ligadura de artéria coronariana evidenciou que a ativação de células Tregs induz a diferenciação de macrófagos M2, levando à substituição de tecido necrótico por uma cicatriz colagenosa estável. Já os camundongos knockout (Foxp3<sup>-</sup>) apresentaram maior quantidade de macrófagos com o fenótipo M1, acelerando o processo inflamatório e o remodelamento cardíaco. Por ter modulado as células Tregs tardiamente ao IM, e mesmo assim ter observado aumento expressivo de macrófagos M2, associado a melhora na sobrevida dos animais. Postulou a existência de uma janela terapêutica para evitar a expansão da zona cardíaca lesada, rupturas ventriculares pós IM, e remodelamento adverso. <sup>145</sup>

Resultados de outro estudo experimental demonstraram, em camundongos de ambos os sexos, que o recrutamento de células Treg pode reduzir a inflamação pós-infarto e prevenir a excessiva degradação da matriz. Fato que atenua o remodelamento adverso devido ao recrutamento de células mononucleares supressivas (células T reg CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>), quando comparado à linhagem correspondente de camundongos CCR5 (-/-). <sup>10</sup> Saxena e cols,<sup>146</sup> em modelo com camundongos transgênicos infartados, demonstraram que a depleção de células Treg exerceu efeitos significativos na disfunção cardíaca e

no tamanho da cicatriz após reperfusão experimental. Neste modelo houve aceleração do processo de dilatação ventricular e maior remodelamento adverso pós IM.

Em nosso estudo, avaliamos o efeito da administração da PIR na mobilização das células Tregs no miocárdio no 7º dia pós IM. Como esperado, os ratos infartados apresentaram grande quantidade de células Tregs, quando comparadas ao grupo controle. Entretanto, ratos que foram tratados com PIR tiveram número menor de Tregs comparados aos ratos não tratados. Fizemos a hipótese de que as células Tregs podem ter tido seu pico antecipado no grupo tratado. Essa hipótese é embasada em dados de estudo prévio de nosso laboratório, que demonstrou que no 3º dia pós IM, a administração de PIR aumenta significativamente a população de linfócitos Tregs na área infartada.

Como citado anteriormente, o processo inflamatório após o IM é importante para promover a cicatrização. Porém uma resposta excessiva pode perpetuar o processo inflamatório e agravar a lesão miocárdica, desenvolvendo assim complicações severas.<sup>72,147</sup> As citocinas pró-inflamatórias são marcadores da atividade inflamatória, por estarem participando diretamente deste processo, sendo o TNF- $\alpha$  uma das mais expressivas. A TNF- $\alpha$  é produzida principalmente por macrófagos, e possui um papel importante na fase aguda por amplificar a resposta inflamatória, sua expressão reduzida no decorrer de poucos dias e é alvo direto da via anti-inflamatória estudada. A IL-1 $\beta$  é também uma citocina de fase aguda, mas presente em toda a fase inflamatória, e é secretada principalmente por monócitos e macrófagos. Já a IL-6 atua nas respostas inatas e adaptativas, e é secretada por macrófagos, linfócitos T e outras células, além de ser estimulada por outras citocinas, como a IL-1.<sup>148,149</sup> Níveis de IL-1 $\beta$  e IL-6 são elevados rapidamente após IM, se mantendo até 12 horas, após este período observa-se seu declínio. O TNF- $\alpha$  apresenta um comportamento semelhante com um pico em torno de 24 após o IM na área de infarto, porém pode ser detectado nas áreas viáveis.<sup>133,147</sup> A partir do 7º dia após IM observamos o declínio de todas estas citocinas pró-inflamatórias<sup>148</sup>. Em outros estudos com modelos experimentais (sepsis e isquemia/ reperfusão) foram descritos a redução destas citocinas após estimulação vagal.<sup>81,83,76</sup> No nosso estudo avaliamos a presença de citocinas pró inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ )

e anti-inflamatória (IL-10) no miocárdio no sétimo dia após IM, e observamos a redução da expressão de todas as citocinas no grupo tratado com PIR. A redução ocorreu em paralelo com a redução da relação M1/M2 e com a redução dos linfócitos Tregs, fato que sugerimos ser a antecipação/aceleração das fases do processo inflamatório. Corroborando com esta sugestão, estudo em modelo experimental observou que as fases do processo de reparação tecidual não mudam, apenas são antecipadas ou prolongadas.<sup>46</sup>

Atribuímos esses resultados ao aumento da modulação vagal ou ao efeito direto da acetilcolina em células do sistema imune em resposta a administração de PIR.

Podemos inferir que no grupo de ratos infartados tratados com PIR o processo inflamatório está mais controlado, por apresentar um perfil anti-inflamatório, com predomínio de células anti-inflamatórias e redução de produção de citocinas; e que esse perfil leva ao melhor remodelamento ventricular com preservação da função do miocárdio, que já foi observado anteriormente pelo nosso grupo e também demonstrado em outros estudos de outros pesquisadores.

## 8) Conclusão

Considerando o conjunto de resultados obtidos que demonstraram maior modulação vagal, redução significativa de citocinas inflamatórias e elevação dos níveis de macrófagos M2, no tecido cardíaco acometido do grupo de animais infartados tratados com PIR, demonstramos que o aumento da modulação parassimpática atua de forma positiva na resposta inflamatória precoce após IM. Acreditamos ter apresentado elementos que agregam informações sobre os mecanismos pelos quais a ativação do reflexo anti-inflamatório colinérgico melhora de parâmetros morfofuncionais pós IM, já descritos em estudos anteriores, evidenciando sua ação na mobilização de células dos SI inato e adaptativo nas fases iniciais da inflamação pós IM.

O conhecimento que vem sendo adquirido sobre a via anti-inflamatória colinérgica parece solidificar uma nova opção terapêutica para pacientes com diferentes patologias que cursam com ativação intensa do processo inflamatório. Podemos fazer a hipótese de que pacientes que sofreram IM podem se tornar um grupo que poderá se beneficiar desta nova modalidade terapêutica.

Contudo, mais estudos precisam ser realizados para confirmar essas hipóteses.

## 9) Bibliografia

1. World Health Organization, Health statistics and informatics Department. Causes of death 2008 summary tables. Abril de 2011 acessado 8/05/2012 em: <http://apps.who.int/ghodata/?vid=10015#>;
2. Yusuf S, Reddy S, Oounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases. Part I: General considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation*. 2001 Nov 27; 104(22): 2746-53;
3. Yusuf S, Reddy S, Oounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases. Part II: Variations in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographical regions and prevention strategies. *Circulation*. 2001 Dez 4; 104(23): 2855-64;
4. Heidenreich PA, Trogon JG, Khavjou OA, Butler J, Dracup K, Ezekowitz MD, Finkelstein EA, Hong Y, Johnston SC, Khera A, Lloyd-Jones DM, Nelson SA, Nichol G, Orenstein D, Wilson PWF, Woo YJ. Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association, *Circulation*. 2011 Mar 1;123(8):933-44;
5. Bloom DE, Cafiero, E.T., Jané-Llopis, E., Abrahams-Gessel, S., Bloom, L.R., Fathima, S., Feigl, A.B., Gaziano, T., Mowafi, M., Pandya, A., Prettner, K., Rosenberg, L., Seligman, B., Stein, A., & Weinstein, C. The Global Economic Burden of Non-communicable Diseases; Geneva: World Economic Forum 2001; último acesso 13/03/2015 em <http://www3.weforum.org/docs>;
6. Robbins SL, Cotran RS. *Patologia – Bases Patológicas das Doenças*. 7ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier 2005. 1480p;
7. Bolli R. Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial dysfunction ("stunned myocardium"). *J Am Coll Cardiol*. 1988 Jul; 12(1): 239-49;
8. Frangogiannis NG, Smith CW, Etman ML. Review - The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2002 Jan; 53(1): 31-47;
9. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res*. 1998 Jun 15; 82(11): 1111-29;
10. Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2010 Mar; 48(3): 504-11;
11. Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular*. 7ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 560 p;
12. Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nature reviews Immunology* 2002; 2(5): 309-22;



13. Von Boehmer H, Kisielow P. Negative selection of the T-cell repertoire: where and when does it occur? *Immunol Rev.* 2006 Feb; 209: 284-9;
14. Von Boehmer H, Melchers F. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2006 Feb; 209: 284-9;
15. Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol.* 2002 Ago; 3(8): 756-63;
16. Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol.* 2011 Nov 11; 11(12): 823-36;
17. Girard JP, Moussion C, Forster R. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat Rev Immunol.* 2012 Nov; 12(11): 762-73;
18. Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4<sup>+</sup> T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev.* 2010 Nov; 238(1): 247-62;
19. Bevan MJ. Helping the CD8<sup>+</sup> T-cell response. *Nat Rev Immunol.* 2004 Aug; 4(8): 595-602.;
20. Campbell DJ, Ziegler SF. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2007 Abr; 7(4): 305-10;
21. Sakaguchi S. Naturally arising FOXP3<sup>-</sup> expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and nonself. *Nat Immunol.* 2005 Abr; 6(4): 345-52;
22. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003 Abr; 4(4): 330-6;
23. Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Int Immunol.* 2004 Nov; 16(11): 1643-56;
24. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/ winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 2001 Jan; 27(1): 68-73;
25. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001 Jan; 27(1): 20-1;
26. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, et al. Xlinked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet.* 2001 Jan; 27(1): 18-20;
27. Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Aug; 120(2): 227-35;

28. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol.* 2012; 30: 531-64;
29. Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation.* 2010 Jun 8; 121(22): 2437-45;
30. Ertl G, Frantz S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2005 Abr 1; 66(1): 22-32.;
31. Frantz S, Hofmann U, Fraccarollo D, Schafer A, Kranepuhl S, Hagedorn I, et al. Monocytes/macrophages prevent healing defects and left ventricular thrombus formation after myocardial infarction. *FASEB J.* 2013 Mar; 27(3): 871-81;
32. Rossen RD, Michael LH, Hawkins HK et al. Cardiolipin–protein complexes and initiation of complement activation after coronary artery occlusion. *Circ Res.* 1994 Set; 75(3): 546-55;
33. Sellak H, Franzini E, Hakim J, Pasquier C. Reactive oxygen species rapidly increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation. *Blood.* 1994 Mai 1; 83(9): 2669-77;
34. Shingu M, Nobunaga M. Chemotactic activity generated in human serum from the fifth component of complement by hydrogen peroxide. *Am J Pathol.* 1984 Nov; 117(2): 201–206;
35. Montrucchio G, Alloatti G, Camussi G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev.* 2000 Out; 80(4): 1669-99;
36. Youker K, Smith CW, Anderson DC, et al. Neutrophil adherence to isolated adult cardiac myocytes. Induction by cardiac lymph collected during ischemia and reperfusion. *J Clin Invest.* 1992 Fev; 89(2): 602-9;
37. Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, et al. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 1998; 98: 699-710;
38. Finkel MS, Hoffman RA, Shen L, et al. Interleukin-6 (IL-6) as a mediator of stunned myocardium. *Am J Cardiol.* 1993 May 15; 71(13): 1231-2;
39. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, et al. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science.* 1992 Jul 17; 257(5068): 387-9;
40. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med.* 2007 Nov 26; 204(12): 3037-47;
41. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005 Dez; 5(12): 953-64;
42. Birdsall HH, Green DM, Trial J, et al. Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion. *Circulation.* 1997 Fev 4; 95(3): 684-92;

43. Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD, Gwechenberger M, Lindsey MH, Mendoza LH, Michael LH, Ballantyne CM, Smith CW, Entman ML. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 1998 Dez; 30(12): 2567-76;
44. Frangogiannis NG<sup>1</sup>, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, Entman ML. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *J Immunol.* 2000 Set 1; 165(5): 2798-808;
45. Mutsaers SE, Bishop JE, McGrouther G, Laurent GJ. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997 Jan; 29(1): 5-17;
46. Leuschner F, Rauch PJ, Ueno T, Gorbatov R, Marinelli B, Lee WW, et al. Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extra medullary monocytopoiesis. *J Exp Med.* 2012 Jan 16; 209(1): 123-37;
47. Sieweke MH, Allen JE. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science.* 2013 Nov 22; 342(6161): 1242974;
48. Lambert JM, Lopez EF, Lindsey ML. Macrophage roles following myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2008 Nov 12; 130(2): 147-58;
49. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008 Dez; 8(12): 958-69;
50. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012; 122(3): 787–795;
51. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med.* 2007 May 14; 204(5): 1057-69;
52. Ramachandran P, Pellicoro A, Vernon MA, Boulter L, Aucott RL, Ali A, Hartland SN, Snowdon VK, Cappon A, Gordon-Walker TT, Williams MJ, Dunbar DR, Manning JR, van Rooijen N, Fallowfield JA, Forbes SJ, Iredale JP. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Nov 13; 109(46): E3186-95;
53. Troidl C, Möllmann H, Nef H, Masseli F, Voss S, Szardien S, Willmer M, Rolf A, Rixe J, Troidl K, Kostin S, Hamm C, Elsässer A. Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction. *J Cell Mol Med.* 2009 Set; 13(9B) :3485-96;
54. Hilgendorf I, Gerhardt LM, Tan TC, Winter C, Holderried TA, Chousterman BG, Iwamoto Y, Liao R, Zirlik A, Scherer-Crosbie M, Hedrick CC, Libby P, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK. Ly-6Chigh Monocytes Depend on Nr4a1 to Balance both Inflammatory and Reparative Phases in the Infarcted Myocardium. *Circ Res.* 2014 Mai 9; 114(10): 1611-22;
55. Heidt T, Courties G, Dutta P, Sager HB, Sebas M, Iwamoto Y, Sun Y, Da Silva N, Panizzi P, van der Laan AM, Swirski FK, Weissleder R, Nahrendorf

- M. Differential Contribution of Monocytes to Heart Macrophages in Steady-State and After Myocardial Infarction. *Circ Res.* 2014 Jul 7; 115(2): 284-95;
56. Frangogiannis NG, Perrard JL, Mendoza LH, Burns AR, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, Entman ML. Stem cell factor induction is associated with mast cell accumulation after canine myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation.* 1998 Ago 18; 98(7): 687-98;
  57. Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 1995 Jun; 27(6): 1281-92;
  58. Lu L, Gunja-Smith Z, Woessner JF, Ursell PC, Nissen T, Galardy RE, Xu Y, Zhu P, Schwartz GG. Matrix metalloproteinases and collagen ultrastructure in moderate myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000 Ago; 279(2): H601-9;
  59. Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, Daemen MJ. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol.* 1995 Ago; 147(2): 325–38;
  60. Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res.* 1999 Aug 1; 250(2): 273-83;
  61. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med.* 2000 Mar 2; 342(9): 626-33.;
  62. Hofmann U, Frantz S. Role of Lymphocytes in Myocardial Injury, Healing, and Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ Res.* 2015 Jan 16; 116(2): 354-67
  63. Varda-Bloom N, Leor J, Ohad DG, Hasin Y, Amar M, Fixler R, Battler A, Eldar M, Hasin D. Cytotoxic T lymphocytes are activated following myocardial infarction and can recognize and kill healthy myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol.* 2000 Dez; 32(12): 2141-9;
  64. Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen WH, Shou Z, Liu P. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation.* 1999 Mar 23;99(11):1492-8
  65. Abbate A, Bonanno E, Mauriello A, Bussani R, Biondi-Zoccai GG, Liuzzo G, Leone AM, Silvestri F, Dobrina A, Baldi F, Pandolfi F, Biasucci LM, Baldi A, Spagnoli LG, Crea F. Widespread myocardial inflammation and infarct-related artery patency. *Circulation.* 2004 Jul 6; 110(1): 46-50. Epub 2004 Jun 21;
  66. Moraru M, Roth A, Keren G, George J. Cellular autoimmunity to cardiac myosin in patients with a recent myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2006 Feb 8; 107(1): 61-6;
  67. Cheng X, Liao YH, Ge H, Li B, Zhang J, Yuan J, Wang M, Liu Y, Guo Z, Chen J, Zhang J, Zhang L. TH1/TH2 functional imbalance after acute myocardial infarction: coronary arterial inflammation or myocardial inflammation. *J Clin Immunol.* 2005 Mai; 25(3): 246-53;

68. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a doubleedged sword. *Nature reviews Immunology* 2006, 6; 508-519;
69. Gaudron P, Eilles C, Kugler I, Ertl G. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction: potential mechanisms and early predictors. *Circulation*. 1993 Mar; 87(3): 755-63;
70. Pfeffer MA. Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Annu Rev Med*. 1995; 46: 455-66;
71. Maisel A, Cesario D, Baird S, Rehman J, Haghighi P, Carter S. Experimental Autoimmune Myocarditis Produced by Adoptive Transfer of Splenocytes After Myocardial Infarction. *Circ Res*. 1998; 82: 458-463
72. Blankesteijn WM, Creemrs E, Lutgens E, Cleutiens JP, Daemen MJ, Smiths JF. Dynamic of cardiac wound healing following myocardial infarction: observations in genetically altered mice. *Acta Physiol Scand*. 2001 Set; 173(1): 75-82;
73. Zornoff LA, Paiva SA, Duarte DR, Spadaro J. Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction: Concepts and Clinical Implications. *Arq Bras Cardiol*. 2009 Fev; 92(2): 150-64;
74. Strom TB, Deisseroth A, Morganroth J, Carpenter CB, Merrill JP. Alteration of the cytotoxic action of sensitized lymphocytes by cholinergic agents and activators of adenylate cycles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972 Out; 69(10): 2995-9;
75. Borovikova LV, Ivanova S, Nardi D, Zhang M, Yang H, Ombrellino M, Tracey KJ. Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. *Auton Neurosci*. 2000 Dez 20; 85(1-3): 141-7;
76. 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 Mai 25; 405(6785): 458-62;
77. Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Ulloa L, Yang H, Sudan S, Czura CJ, Ivanova SM, Tracey KJ. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Exp Med*. 2002 Mar 18; 195(6): 781-8;
78. Pavlov VA, Ochani M, Gallowitsch-Puerta M, Ochani K, Huston JM, Czura CJ, Al-Abed Y, Tracey KJ. Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 28; 103(13): 5219–5223;
79. Le Novere N, Changeux JP. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol*. 1995 Fev; 40(2): 155-72;
80. Steinlein, O. New functions for nicotine acetylcholine receptors? *Behav Brain Res*. 1998 Set; 95(1): 31-5;
81. 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. Epub 2002 Dec 22;
82. Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic anti-inflammatory pathway. *J Clin Invest*. 2007 Feb 1; 117(2): 289–296;
  83. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature*. 2002 Dez 19-26; 420(6917): 853-9.
  84. Huston JM, Ochani M, Rosas-Ballina M, Liao H, Ochani K, Pavlov VA, Gallowitsch-Puerta M, Ashok M, Czura CJ, Foxwell B, Tracey KJ, Ulloa L. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J Exp Med*. 2006 Jul 10; 203(7): 1623-8. Epub 2006 Jun 19;
  85. Vida G, Pena G, Deitch EA, Ulloa L.  $\alpha 7$ -cholinergic receptor mediates vagal induction of splenic norepinephrine. *J Immunol*. 2011 Abr 1; 186(7): 4340-6;
  86. Nance DM, Sanders VM. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain Behav Immun*. 2007 Aug;21(6):736-45. Epub 2007 Apr 27;
  87. Sternberg EM. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific. *Nat Rev Immunol*. 2006 Abr; 6(4): 318–328;
  88. Izeboud CA, Mocking JA, Monshouwer M, van Miert AS, Witkamp RF. Participation of beta-adrenergic receptors on macrophages in modulation of LPS-induced cytokine release. *J Recept Signal Transduct Res*. 1999 Jan-Jul; 19(1-4): 191-202;
  89. Bratton BO, Martelli D, McKinley MJ, Trevaks D, Anderson CR, McAllen RM. Neural regulation of inflammation: no neural connection from the vagus to splenic sympathetic neurons. *Exp Physiol*. 2012 Nov; 97(11): 1180-5;
  90. Miao FJ, Janig W, Levine J. Role of sympathetic postganglionic neurons in synovial plasma extravasation induced by bradykinin. *J Neurophysiol*. 1996 Feb; 75(2): 715-24;
  91. Gautron L, Rutkowski JM, Burton MD, Wei W, Wan Y, Elmquist JK. Neuronal and nonneuronal cholinergic structures in the mouse gastrointestinal tract and spleen. *J Comp Neurol*. 2013 Nov;521(16):3741-67;
  92. Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M, Valdes-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 Out 7; 334(6052): 98-101;
  93. Rogausch H, Zwingmann D, Trudewind M, del Rey A, Voigt KH, Besedovsky H. Local and systemic autonomic nervous effects on cell migration to the spleen. *J Appl Physiol (1985)*. 2003 Feb; 94(2): 469-75;
  94. Antonica A, Magni F, Mearini L, Paolucci N. Vagal control of lymphocyte release from rat thymus. *J Auton Nerv Syst*. 1994 Aug;48(3):187-97;
  95. Martelli D, McKinley MJ, McAllen RM. The cholinergic anti-inflammatory pathway: A critical review. *Auton Neurosci*. 2014 May;182:65-9;

96. Pavlov VA. Cholinergic Modulation of Inflammation. *Int J Clin Exp Med*. 2008; 1(3): 203-12;
97. Keeler JR, Hurst CG, Dunn MA. Pyridostigmine used as a nerve agent pretreatment under wartime conditions. *JAMA*. 1991 Ago 7; 266(5): 693-5;
98. Breyer-Pfaff U, Schumm F, Maier U, Brinkmann AM. Pyridostigmine kinetics in healthy subjects and patients with myasthenia gravis. *Clin Pharmacol Ther*. 1985 Mai; 37(5): 495-501;
99. Castro RRT, Porphirio G, Serra SM, Nóbrega ACL. Cholinergic stimulation with pyridostigmine reduces the QTc interval in coronary artery disease. *Braz J Med Biol Res*. 2002 Jun; 35(6): 685-9;
100. Sant'anna ID, Nóbrega AC. Cardiac function during mental stress: cholinergic modulation with pyridostigmine in healthy subjects. *Clin Sci (Lond)*. 2003 Ago; 105(2): 161-5;
101. Raj SR, Black BK, Biaggioni I, Harris PA, Robertson D. Acetylcholinesterase inhibition improves tachycardia in postural tachycardia syndrome. *Circulation*. 2005 Mai 31; 111(21): 2734-40;
102. 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; 40; 610-616;
103. Lataro RM. O aumento da regulação parassimpática pela piridostigmina melhora o desempenho cardiocirculatório e a remodelação do ventrículo esquerdo na insuficiência cardíaca. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, SP, Brasil, 2011;
104. De La Fuente RN, Irigoyen MC ET AL. Enhancement of vagal-mediated heart rate responsiveness by cholinergic stimulation in rats. *Journal of Hypertension* 2004; 22; suppl I;
105. Richard PS, McCreath H, Tracey KJ, Sidney S, Liu K, Seeman T. RR interval Variability is inversely related to inflammatory markers: The CARDIA Study. *Mol Med*. 2007 Mar-Abr; 13(3-4): 178-84;
106. Janszky I, Ericson M, Lekander M, Blom M, Buhlin K, Georgiades A, Ahnve S. Inflammatory markers and heart rate variability in women with coronary heart disease. *J Intern Med*. 2004 Nov; 256(5): 421-8;
107. Mann DL, McMurray JJ, Packer M, Swedberg K, Borer JS, Colucci WS, Dijan J, Drexler H, Feldman A, Kober L, Krum H, Liu P, Nieminen M, Tavazzi L, van Veldhuisen DJ, Waldenstrom A, Warren M, Westheim A, Zannad F, Fleming T. Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL). *Circulation*. 2004 Abr 6; 109(13): 1594-602;
108. Chung ES, Packer M, Lo KH, Fasanmade AA, Willerson JT. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF therapy against

- congestive heart failure (ATTACH) trial. *Circulation*. 2003 Jul 1; 107(25): 3133-40;
109. Klinkenberg S, Aalbers MW, Vles JS, Cornips EM, Rijkers K, Leenen L, et al. Vagus nerve stimulation in children with intractable epilepsy: a randomized controlled trial. *Dev Med Child Neurol*. 2012 Set; 54(9): 855-61;
  110. Aaronson ST, Carpenter LL, Conway CR, Reimherr FW, Lisanby SH, Schwartz TL, et al. Vagus nerve stimulation therapy randomized to different amounts of electrical charge for treatment-resistant depression: *Brain Stimul*. 2013 Jul; 6(4): 631-40;
  111. Undurti N Das. Can vagus nerve stimulation halt or ameliorate rheumatoid arthritis and lupus? *Lipids Health Dis*. 2011 Jan 24; 10:19;
  112. Klein HU1, Ferrari GM. Vagus nerve stimulation: A new approach to reduce heart failure. *Cardiol J*. 2010; 17(6): 638-44.
  113. Manual CEUA ANESTESIA EUTANASIA UNINOVE 2012, disponível em <http://www.uninove.br/PDFs/Publicacoes> último acesso em 15/01/2015;
  114. Tracey KJ. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9: 418-2 *Nat Rev Immunol*. 2009 Jun; 9(6): 418-28;
  115. Cheng Z, Li-Sha G, Jing-Lin Z, Wen-Wu Z, Xue-Si C, Xing-Xing C, Yue-Chun L. Protective role of the cholinergic anti-inflammatory pathway in a mouse model of viral myocarditis. *PLoS One*. 2014 Nov 14; 9(11): e112719;
  116. Minutoli L, Squadrito F, Nicotina PA, Giuliani D, Ottani A, Polito F, Bitto A, Irrera N, Guzzo G, Spaccapelo L, Fazzari C, Macrì A, Marini H, Guarini S, Altavilla D. Melanocortin 4 receptor stimulation decreases pancreatitis severity in rats by activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Crit Care Med*. 2011 Mai; 39(5): 1089-96;
  117. Du MH, Luo HM, Hu S, Lv Y, Lin ZL, Ma L. Electroacupuncture improves gut barrier dysfunction in prolonged hemorrhagic shock rats through vagus anti-inflammatory mechanism. *World J Gastroenterol*. 2013 Sep 28;19(36):5988-99;
  118. de Cuba MB, Machado MP, Farnesi TS, Alves AC, Martins LA, de Oliveira LF, Capitelli CS, Leite CF, Silva MV, Machado JR, Kappel HB, de Campos HS, Paiva L, Gomes NL, Faleiros AC, Britto CF, Savino W, Moreira OC, Rodrigues V Jr, Montano N, Lages-Silva E, Ramirez LE, da Silva VJ. Effects of cholinergic stimulation with pyridostigmine bromide on chronic chagasic cardiomyopathic mice. *Mediators Inflamm*. 2014; 2014: 475946;
  119. Zhang R, Wugeti N, Sun J, Yan H, Guo Y, Zhang L, Ma M, Guo X, Jiao C, Xu W, Li T, Liu H, Ma Y. Effects of vagus nerve stimulation via cholinergic anti-inflammatory pathway activation on myocardial ischemia/reperfusion injury in canine. *Int J Clin Exp Med*. 2014 Set 15; 7(9): 2615-23;
  120. Terrando N, Yang T, Ryu JK, Newton PT, Monaco C, Feldmann M, Ma D, Akassoglou K, Maze M. Stimulation of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor protects against neuroinflammation after tibia fracture and endotoxemia in mice. *Molecular Medicine* 2014; 29;



121. Leib C, Katus HA, Kaya Z. cholinergic control of inflammatory in cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med.* 2013 Feb; 23(2): 46-51;
122. Yu H, Tang M, Yu J, Zhou X, Zeng L, Zhang S. Chronic vagus nerve stimulation improves left ventricular function in a canine model of chronic mitral regurgitation. *J Transl Med.* 2014 Nov 4; 12(1): 302;
123. Pohanka M. Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. *Int J Mol Sci.* 2014 Jun 2; 15(6): 9809-25.;
124. Zarei AA, Foroutan SA, Foroutan SM, Erfanian Omidvar A. Enhancement of Frequency Domain Indices of Heart Rate Variability by Cholinergic Stimulation with Pyridostigmine Bromide. *Iran J Pharm Res.* 2011 Fall; 10(4): 889-94;
125. Castro RR, Porphirio G, Serra SM, Nobrega AC. Cholinergic stimulation with pyridostigmine protects against exercise induced myocardial ischaemia. *Heart* 2004; 90; 1119–1123;
126. Li CL, Jiang J, Fan YQ, Fu GS, Wang JA, Fan WM. Knockout of the tumor necrosis factor a receptor 1 gene can up-regulate erythropoietin receptor during myocardial ischemia-reperfusion injury in mice. *Chin Med J (Engl).* 2009 Mar 5; 122(5): 566-70;
127. Sabino JPJ, da Silva CAA, Fazan R Jr, Salgado HC. The treatment with pyridostigmine improves the cardiocirculatory function in rats with chronic heart failure. *Auton Neurosci.* 2013 Dez; 179(1-2): 43-8;
128. Sabino JPJ, da Silva CAA, Giusti H, Glass ML, Salgado HC, Fazan R Jr. Parasympathetic activation by pyridostigmine on chemoreflex sensitivity in heart-failure rats. *Auton Neurosci.* 2013 Dez; 179(1-2): 43-8;
129. Lu Y, Liu JJ, Bi XY, Yu XJ, Kong SS, Qin FF, Zhou J, Zang WJ. Pyridostigmine ameliorates cardiac remodeling induced by myocardial infarction via inhibition of the transforming growth factor- $\beta$ 1/TGF- $\beta$ 1 – activated kinase pathway. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014 May;63(5):412-20;
130. Qin F, Lu Y, He X, Zhao M, Bi X, Yu X, Liu J, Zang W. Pyridostigmine prevents peripheral vascular endothelial dysfunction in rats with myocardial infarction. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2014 Mar; 41(3): 202-9;
131. Matteoli G, Gomez-Pinilla PJ, Nemethova A, Di Giovangiulio M, Cailotto C et al. A distinct vagal anti-inflammatory pathway modulates intestinal muscularis resident macrophages independent of the spleen. *Gut.* 2014 Jun; 63(6): 938-48;
132. Hashimoto T, Ichiki T, Watanabe A, Hurt-Camejo E, Michaëlsson E, Ikeda J, Inoue E, Matsuura H, Tokunou T, Kitamoto S, Sunagawa K. Stimulation of  $\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor by AR-R17779 suppresses atherosclerosis and aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Vascul Pharmacol.* 2014 Mai-Jun; 61(2-3): 49-55;
133. Calvillo L, Vanoli E, Andreoli E, Besana A, Omodeo E, Gneccchi M, Zerbi P, Vago G, Busca G, Schwartz PJ. Vagal Stimulation, through its nicotinic action, limits infarct size and the inflammatory response to myocardial

- ischemia and reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011 Nov; 58(5): 500-7;
134. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*. 2009 27:451–83
  135. Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, Baeten M, Stangé G, Van den Bossche J, Mack M, Pipeleers D, In't Veld P, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C (high) monocytes. *Cancer Res*. 2010 Jul 15;70 (14):5728-39
  136. 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 Set; 62: 24-35;
  137. Vandervelde S, van Amerongen MJ, Tio RA, Petersen AH, van Luyn MJ, Harmsen MC. Increased inflammatory response and neovascularization in reperfused vs. non-reperfused murine myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol*. 2006 Mar-Apr; 15(2): 83-90;
  138. Marsland AL, Gianaros PJ, Prather AA, Jennings JR, Neumann SA, Manuck SB. Stimulated production of proinflammatory cytokines covaries inversely with heart rate variability. *Psychosom Med*. 2007 Nov; 69(8): 709-16;
  139. Lv H, Havari E, Pinto S, Gottumukkala RV, Cornivelli L, Raddassi K, Matsui T, Rosenzweig A, Bronson RT, Smith R, Fletcher AL, Turley SJ, Wucherpfennig K, Kyewski B, Lipes MA. Impaired thymic tolerance to  $\alpha$ -myosin directs autoimmunity to the heart in mice and humans. *J Clin Invest*. 2011 Apr; 121(4): 1561-73;
  140. Lichtman AH. The heart of the matter: Protection of the myocardium from T cells. *J Autoimmun*. 2013 Set; 45: 90-6;
  141. Hofmann U, Beyersdorf N, Weirather J, Podolskaya A, Bauersachs J, Ertl G, Kerkau T, Frantz S. Activation of CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2012 Abr 3; 125(13): 1652-63;
  142. Liao YH, Cheng X. Autoimmunity in myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2006 Sep 10; 112(1): 21-6;
  143. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self tolerance. *Cell*. 2000 Mai 26; 101(5): 455-8;
  144. Matsumoto Y, Park IK, Kohyama K. Matrix metalloproteinase (MMP)-9, but not MMP-2, is involved in the development and progression of C protein-induced myocarditis and subsequent dilated cardiomyopathy. *J Immunol*. 2009 Out 1; 183(7): 4773-81;
  145. Weirather J, Hofmann UD, Beyersdorf N, Ramos GC, Vogel B, Frey A, Ertl G, Kerkau T, Frantz S. Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. *Circ Res*. 2014 Jun 20; 115(1): 55-67;

146. Saxena A, Dobaczewski M, Rai V, Haque Z, Chen W, Li N, Frangogiannis NG. Regulatory T cells are recruited in the infarcted mouse myocardium and may modulate fibroblast phenotype and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014 Oct 15; 307(8): H1233-42;
147. Deten A, Volz HC, Wilfried B, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. *Experimental studies in rats. Cardiovasc Res.* 2002 Aug 1; 55(2): 329-40;
148. Shimaoka M, Park EJ. Advances in understanding sepsis. *Eur J Eur J Anaesthesiol Suppl.* 2008; 42: 146-53;
149. Schulz R. TNF $\alpha$  in myocardial ischemia/reperfusion: damage vs. protection. *J Mol Cell Cardiol.* 2008 Dec; 45(6): 712-4.