

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

**PAPEL DA ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA NA
REMODELAÇÃO VENTRICULAR E POLARIZAÇÃO DE
MACRÓFAGOS NO MIOCÁRDIO DE RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)**

GIZELE ALVES NEVES

SÃO PAULO

2016

GIZELE ALVES NEVES

**PAPEL DA ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA NA
REMODELAÇÃO VENTRICULAR E POLARIZAÇÃO DE
MACRÓFAGOS NO MIOCÁRDIO DE RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)**

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

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

SÃO PAULO

2016

Neves, Gizele Alves.

Efeito da estimulação colinérgica no remodelamento ventricular e polarização de macrófagos após infarto do miocárdio em ratos hipertensos.
/ Gizele Alves Neves. 2016.

78 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE,
São Paulo, 2016.

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

1. Hipertensão. 2. Infarto do miocárdio. 3. Brometo de piridostigmina.
4. Colinérgicos. 5. Neuroimunomodulação.

I. Colombo, Fernanda Marciano Consolim.

II. Título.

CDU 616

São Paulo, 12 de agosto de 2016.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: **Gizele Alves Neves**

Título da Dissertação: “**Efeito da estimulação colinérgica no remodelamento ventricular e polarização de macrófagos após infarto do miocárdio em ratos hipertensos**”

Presidente: Profa. Dra. Fernanda Marciano Consolim Colombo Fernanda Marciano Consolim Colombo

Membro: Profa. Dra. Vera de Moura Azevedo Farah Vera de Moura Azevedo Farah

Membro: Prof. Dr. Heno Ferreira Lopes Heno Ferreira Lopes

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, José Alves e Maria do Rosário, que sempre me incentivaram e investiram no meu crescimento profissional, mesmo sofrendo com a distância. Obrigada pelo amor incondicional, apoio, conselhos, por me mostrarem que determinação e coragem são necessárias para vencer qualquer barreira, e principalmente, que nunca devemos perder a fé na vida. À minha irmã Michelly, cunhado Sandro e sobrinhos Anny, Ana e Eduardo, ao meu esposo Emerson, a minha amiga Luciana, pelo amor, apoio, pelos conselhos, paciência. Obrigada meus amores, sem a força de vocês não seria possível chegar até aqui. Vocês também são responsáveis por essa conquista.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Acima de tudo agradeço a Deus, que me proporcionou o dom da vida, dando-me sabedoria, equilíbrio nos momentos difíceis.

A minha orientadora Profa. Dra. Fernanda Colombo, um exemplo de dedicação, postura e ética. Minha mãe científica, grande incentivadora da pesquisa, meu respeito e admiração. Ser sua aluna e saber que faço parte dessa família me deixa extremamente orgulhosa! Obrigada pelo apoio, orientações, conselhos e até puxões de orelha.

A minha co orientadora Profa. Dra. Pamela Ramona, pelos seus preciosos ensinamentos, atenção, paciência, dedicação, conselhos e orientação, não tenho palavras suficientes para agradecer. Muito Obrigada!

A Profa. Dra. Cristiane França pela sua atenção, paciência, simplicidade e segurança nas suas sugestões. Muito obrigada pela atenção e pelas horas dedicadas às correções deste trabalho. Muito obrigada!

A Profa. Dra Maria Claudia Irigoyen, um exemplo de postura e ética, Obrigada pela atenção, conselhos e orientação.

Ao meu grande professor, pai científico Prof. Dr. Marcelo Rubira, exemplo de professor e pesquisador, que confiou e acreditou no meu trabalho durante a iniciação científica e que despertou minha paixão pela pesquisa. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr Paulo Magno, pela disponibilidade, dedicação e ensinamentos, professor deixo aqui minha admiração. Muito obrigada!

A Marcia Koike pela ajuda e disponibilidade durante a realização deste trabalho.

A todos os membros do laboratório da Uninove, Angela, Prof Humberto Dellê, Juliana, Luis. A ajuda, conselhos e ensinamentos de vocês foram primordiais para término deste trabalho. Muito Obrigada!

A equipe do laboratório de Hipertensão Experimental do Instituto do Coração, Leandro, Fernando, Maikon e seu Edson. Obrigada pela ajuda!

Aos funcionários dos biotérios, pelo cuidado e manutenção dos animais.

Ao meu esposo, amigo e parceiro de todas as horas Emerson, obrigada pela ajuda, conselhos nos momentos difíceis, seu apoio foi essencial.

Aos meus queridos amigos e parceiros, Otávio, Luciana, Ariane, Juliane, a ajuda de vocês foi primordial, muito obrigada pela ajuda, apoio, conselhos. Sou grata a vida por ter a amizade de vocês.

RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença multifatorial, que além da disfunção autonômica, a inflamação parece desempenhar importante papel no desenvolvimento e manutenção dos elevados níveis de pressão arterial. Devido a sua crescente relação com graves repercussões clínicas cardiovasculares, dentre elas o infarto agudo do miocárdio (IAM), a busca de novos conhecimentos sobre a via anti-inflamatória colinérgica emerge na literatura devido ao seu potente efeito na modulação da resposta inflamatória via nervo vago. **Objetivo:** Avaliar os efeitos da estimulação parassimpática, por meio da administração do antagonista farmacológico brometo de piridostigmina, sobre o remodelamento ventricular e a polarização de macrófagos na fase subaguda do infarto do miocárdio em ratos SHR. **Métodos:** O estudo foi realizado em uma fase subaguda pós IAM em ratos da linhagem SHR (peso 250 a 300g), divididos em 3 grupo experimentais: Grupo controle SHAM (CS), grupo infarto controle (IC) e grupo infarto tratamento (IP). Os animais foram acompanhados durante 7 dias de protocolo, sendo considerado o dia 0, o dia em que foi realizada a ligadura da artéria coronária esquerda nos grupos IC e IP e início do tratamento com brometo de piridostigmina com a dose de 40 mg/kg/dia no grupo IP. A partir do dia 04 de protocolo foram realizados registros diretos da pressão arterial (PA), modulação autonômica cardiovascular (Variabilidade da frequência cardíaca e sistólica) e avaliação da função ventricular com a técnica de ecoDoplercardiografia. Posteriormente, os animais foram eutanasiados para a coleta do tecido cardíaco, para as avaliações de imunohistoquímica. **Análise estatística:** Para a comparação entre os grupos, foi utilizado a análise de variância (ANOVA) multifatorial, post hoc Bonferroni, com $p < 0,05$. **Resultados:** O BP diminuiu os

valores de PAM em relação ao CS (IP:139±7 vs CS:172±6), melhorou a função sistólica evidenciadas através da fração de encurtamento e de ejeção, e aumentou a concentração de macrófagos do tipo 2 (IP:67±7 vs IC:50±4), não foram observados diferenças nos parâmetros de modulação autonômica cardíaca e colágeno total. **Conclusão:** Estes resultados evidencia uma abordagem farmacológica envolvendo a inibição da acetilcolinesterase induzindo efeitos benéficos sobre o perfil hemodinâmico, função cardíaca e modulação inflamatória subaguda após o IAM em ratos espontaneamente hipertensos.

Palavra-chave: Hipertensão, Infarto do miocárdio, brometo de piridostigmina, Colinérgicos, Neuroimunomodulação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho Experimental

Figura 2. Esquema do sistema de registro de pressão arterial

Figura 3. Lâminas coradas com hematoxilina e eosina

Figura 4. Método indireto de Imunohistoquímica pelo complexo Avidina-Biotina-Peroxidase.

Figura 5. Imagem no programa ImageJ para contagem das células.

Figura 6. Mensuração do tamanho do infarto: PE IAM (perímetro externo do infarto), PI IAM (perímetro interno do infarto), AE VE (área externa do ventrículo esquerdo), AI VE (área interna do ventrículo esquerdo).

Figura 7. Fórmula para cálculo da área de infarto.

Figura 8: Contagem de colágeno % área

Figura 9. Curva de mortalidade dos animais SHR

Figura 10. Marcação de macrófagos totais

Figura 11. Quantificação de Macrófagos total no tecido cardíaco dos grupos (CS, IC e IP).

Figura 12. Padrão observado na distribuição de infiltrado de macrófagos total no tecido cardíaco.

Figura 13. Marcação dos macrófagos M2

Figura 14. Quantificação de macrófagos M2 no tecido cardíaco do rato SHR (CS, IC e IP)

Figura 15. Mensuração do tamanho do infarto: PE IAM (perímetro externo do infarto), PI IAM (perímetro interno do infarto), AE VE (área externa do ventrículo esquerdo), AI VE (área interna do ventrículo esquerdo).

Figura 16. Quantificação de colágeno total no tecido cardíaco do rato SHR (CS, IC e IP).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso corporal inicial dos animais estudados.

Tabela 2. Valores representativos das variáveis hemodinâmicas dos grupos estudados

Tabela 3. Variabilidade do intervalo de pulso no domínio do tempo e da frequência dos grupos hipertensos, controle SHAM (CS), infartados controle (IC) e infartado tratado com PIR (IP).

Tabela 4. Dados ecocardiográficos avaliados sete dias após o IAM.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach - Acetilcolina (neurotransmissor)

AVE- Acidente Vascular Encefálico

CS- Grupo Controle SHAM

DCVs- Doenças Cardiovasculares

FC – Frequência cardíaca

HAS- Hipertensão Arterial Sistêmica

HF – Alta frequência (do inglês *High Frequency*)

HF nu- Alta Frequência Relativa

HE- Hematoxilina e eosina

IC- Grupo Infarto Controle

IC- Insuficiência cardíaca

IP- Grupo Infarto Tratado com Piridostigmina

IAM- Infarto agudo do miocárdio

LF - Baixa frequência (do inglês *Low Frequency*)

LF nu- Baixa Frequência Relativa

LF/HF- Balanço Autonômico

LVEDP- Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo

MEC - Matriz extracelular

PA- Pressão Arterial

PAS- Pressão Arterial Sistólica

PAD- Pressão Arterial Diastólica

PAM- Pressão Arterial Média

PIR - Brometo de piridostigmina

PBS - Tampão fosfato salino

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

RR- Normais adjacentes

SI- Sistema Imune

SHR- Ratos Espontaneamente Hipertensos

SNC- Sistema Nervoso Central

SNA- Sistema Nervoso Autônomo

SCA - Síndrome coronariana aguda

SDNN - Desvio padrão de todos os intervalos RR

VD - Ventrículo Direito

VE - Ventrículo esquerdo

VLF – Muito baixa frequência (do inglês *Very Low Frequency*)

VFC- Variabilidade da frequência cardíaca

SUMÁRIO

RESUMO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Doenças Cardiovasculares.....	1
1.2 Síndrome Coronariana Aguda e Inflamação	2
1.3 Resposta imune inata e Adaptativa pós infarto do miocárdio.....	3
1.4 Via anti-inflamatória colinérgica.....	6
1.5 Estimulação Colinérgica com Piridostigmina	8
1.6 Modelo experimental de HAS e IAM.....	10
2. JUSTIFICATIVA.....	11
3. OBJETIVO GERAL.....	12
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
5.1 Sequência Experimental.....	13
5.2 Modelo Experimental	14
5.3 Canulação.....	15
5.4 Registros da Pressão Arterial.....	16
5.5 Modulação Autonômica Cardiovascular.....	17
5.6 Avaliação da área infartada por Ecodopplercardiografia.....	17
5.7 Eutanásia e coleta dos tecidos.....	19
5.8 Análise Histopatológica da área do infarto.....	20
5.9 Avaliações da expressão de macrófagos na área de infarto por meio da imunohistoquímica.....	21
5.10 Avaliação do tamanho do infarto.....	24

5.11 Análises quantitativa das fibras de colágeno.....	26
6. ANALISE DE DADOS.....	27
7. RESULTADOS.....	28
7.1 Composição corporal.....	28
7.2 Curva de mortalidade.....	28
7.3 Análises da Variabilidade da Pressão Arterial e Frequência cardíaca.	29
7.4 Analise Ecocardiografica.....	32
7.5 Imunohistoquimica do coração.....	34
7.6 Avaliação da área do infarto.....	37
7.7 Analise quantitativa das fibras de colágeno.....	38
8. DISCUSSÃO.....	40
9. CONCLUSÃO.....	48
10. BIBLIOGRAFIA.....	49

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de mortalidade e morbidade por doenças não transmissíveis¹. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde², no ano de 2012, 17,5 milhões de pessoas morreram em decorrência destas doenças representando 31% das causas de mortalidade no mundo. E no Brasil, as taxas de mortalidade por DCV apresentam índices semelhantes aos dados mundiais da saúde, representando cerca de 33% destas^{3,4}.

Levantamentos epidemiológicos, obtidos através do seguimento longitudinal de grandes populações, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) foi apontada como um dos principais fatores determinantes de morbimortalidade cardiovascular. De fato, sequelas cardiovasculares, incluindo acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio, ocorreram com frequência global 2 a 3 vezes maior em hipertensos, quando comparados com normotensos da mesma idade⁵.

Isso porque a HAS é uma doença crônica, associada a alterações funcionais e/ou estruturais vasculares, como a disfunção endotelial, que por sua vez, apresenta um importante papel patogênico no desenvolvimento inicial da aterosclerose e síndromes coronarianas⁶.

Diante disso, e considerando que a HAS é um fator de risco bem estabelecido para o desenvolvimento de importantes manifestações clínicas cardiovasculares, é indiscutível a importância dos fatores relacionados à compreensão da sua fisiopatologia, bem como definir novas estratégias

terapêuticas que visam um melhor prognóstico da HAS associada as suas comorbidades⁷. Como por exemplo, o infarto agudo do miocárdio, foco de nosso estudo.

1.2 Síndrome Coronariana Aguda e Inflamação

A síndrome coronariana aguda (SCA) se caracteriza por um grupo variado de agravos cardiovasculares, dos quais se destaca o infarto agudo do miocárdio (IAM) por ser um evento abrupto, de elevada mortalidade e morbidade mundial^{8,9}.

O termo IAM se refere à lesão isquêmica originária de uma redução severa ou completa do aporte sanguíneo para os cardiomiócitos, provocando morte celular^{10,11,12}. A evolução da necrose isquêmica depende da extensão e duração da isquemia, da intensidade de circulação colateral e do estado prévio do miocárdio¹³. Uma isquemia cardíaca por menos de cinco minutos já é suficiente para causar anormalidades funcionais durante 48 horas nos cardiomiócitos, mas sendo reversível e apresentar pouca ou nenhuma reação inflamatória¹⁴.

O processo inflamatório causado pelo IAM se faz necessário para promover a reparação tecidual da área necrótica e formação da cicatriz, a alterando assim a matriz extracelular (MEC), que influencia decisivamente na forma cardíaca. Este rompimento inicial na zona acometida, promove precocemente a expansão do infarto que é seguido pela deposição de colágeno em substituição no parênquima. Nesta fase, as forças mecânicas e respostas inflamatórias sobre a MEC, influenciam decisivamente a estabilidade e impactando no prejuízo da formação da cicatriz¹⁵.

Além disso, o estresse mecânico promove a manutenção do processo inflamatório, por gerar elevadas concentrações de citocinas IL-6 (atua como uma citocina pró-inflamatória. É produzida pelos macrófagos ativos e por linfócitos T), TNF α (grupo de citocinas capaz de provocar a apoptose de células tumorais e que possuem uma vasta gama de ações pró-inflamatórias. É secretado principalmente por macrófagos) e IL-1 β (secretada pelos macrófagos, monócitos e linfócitos B, participa na regulação das respostas imunes, reações inflamatórias) na área acometida. O TNF α e IL-1 β induzem a expressão de citocinas secundárias tais como IL-6 e IL-8. As IL-6 e IL-8 estimulam a migração de leucócitos, os quais aumentam a concentração de citocinas IL-1 β e IL-8^{16,17}.

Simultaneamente à necrose miocárdica, há um processo de remodelamento ventricular, embora no início o remodelamento possa ser adaptativo e permita manter a função miocárdica, o remodelamento progressivo inevitavelmente leva a piora da função e a um pior prognóstico¹⁸.

Nesse sentido, o remodelamento e reparação miocárdica dependem da eficiência do sistema imunológico na zona do infarto. A qualidade da cicatriz, por sua vez, impacta nas alterações clínicas posteriores. Sendo assim, a compreensão do processo inflamatório e atuação do sistema imune neste processo, é um potencial, no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

1.3 Resposta imune inata e Adaptativa pós infarto do miocárdio

O macrófago é uma importante célula do sistema imunológico que tem sua participação na imunidade inata e adaptativa, através da fagocitose de partículas desconhecidas, na função de apresentação de抗ígenos, ação

microbicida¹⁹ e da sua capacidade de produzir mediadores que interferem na função imunológica²⁰.

O processo de resposta do sistema imunológico é compreendido por duas respostas que se relacionam entre si. Uma delas é de amplo espetro, denominada de resposta imunológica inata ou natural. É mais imediata e com um espectro de ação alargado, atuando na presença de estruturas moleculares conservadas presentes em agentes patogénicos^{21,22}. Alguns estudos recentemente demonstraram que o número de leucócitos no sangue periférico, e a razão polimorfonucleares / linfócitos, nas primeiras horas de infarto tem forte valor preditivo de morte em pacientes com infarto agudo do miocárdio^{23,24,25}. Outros mostraram que neutrófila e em menor extensão monocitose e linfopenia também são marcadores de prognóstico pós infarto^{26,27}.

A segunda resposta imunológica mais específica é denominada de resposta imunológica adaptativa ou adquirida, levando mais tempo a desenvolver-se e é resultado da ativação de uma série de células (linfócitos) e moléculas solúveis, que interagem e funcionam de uma forma sinérgica e específica para eliminar ou apenas neutralizar um estímulo agressor²⁸.

No IAM os macrófagos são funcionalmente heterogêneos e podem ser classificados respectivamente em M1 e M2, baseados na expressão de marcadores de superfície. A transição a partir da fase inflamatória inicial e cicatrização é denominada inflamatória de neutrófilos, monócitos e macrófagos M1.

Os macrófagos M1 são predominantes no terceiro dia pós IAM e exibem altos níveis de expressão de mediadores pró-inflamatórios. Já na fase de resolução do processo inflamatório, fase tardia, temos os macrófagos M2. Os

macrófagos M2, predominam no quinto dia pós IAM, e expressam, além de genes pró inflamatórios, altos níveis de citocinas anti-inflamatórias IL-10 e altos níveis de genes de reparação. Este pode ser atrasada ou deficiente em muitos pacientes ²⁹. Assim, as funções típicas do macrófago M2 durante a reparação pode ser insuficiente. Cada vez mais, acredita-se que a transição de polarização de macrofagos do M1 a M2 é um evento chave na reparação no processo do IAM ³⁰.

Heidt e cols (2014), utilizando um modelo experimental, demonstraram uma prevalência de monócitos na fase precoce de cicatrização, adicionalmente, estes monócitos se diferenciam em células M2 que secretam mediadores envolvidos na resolução da inflamação. E estes macrófagos derivados de monócitos tem grande capacidade de proliferação *in situ* ³¹. Importante ressaltar que macrófagos, monócitos e mastócitos são grandes secretores de citocinas e fatores de crescimento necessários para a proliferação de fibroblastos e angiogênese ^{32,33,34}.

Estudo realizado em nosso grupo com ratos normotensos, Wistar demonstrou que ao final do sétimo dia após infarto, os animais tratados com PIR apresentaram uma relação dos tipos de macrófagos M1/M2 mais reduzida no grupo IP (grupo infartado com tratamento) quando comparado com o grupo não tratado CS (grupo controle SHAM), demonstrando a prevalência de uma característica anti-inflamatória. Foram observados também redução das concentrações de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10) no VE de ratos após infarto do miocárdio ³⁵.

1.4 Via anti-inflamatória colinérgica

Considerando a íntima relação entre lesão isquêmica do IAM e a resposta inflamatória, podemos ressaltar que a compreensão mais ampla desta relação e da modulação da resposta inflamatória pode resultar em melhorias terapêuticas neste tipo de agravo cardiovascular. Há uma necessidade da compreensão da existência de uma via de comunicação entre o sistema imune (SI) e o sistema nervoso central (SNC) na modulação da resposta inflamatória, via sistema nervoso autonômico parassimpático. Esta interação faz parte de um complexo reflexo que ficou conhecido como “reflexo anti-inflamatório colinérgico”³⁶.

Como todo o reflexo, este apresenta duas vias: uma aferente e outra eferente. Na via aferente temos o sistema imune que na presença de antígeno libera produtos inflamatórios que são detectadas pelos ramos sensitivos aferentes vagais que por sua vez são transmitidos a centros integradores centrais desencadeando uma modulação da síntese de citocinas inflamatórias³⁷. 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- α ^{38,39}.

Em resumo, verificou-se que mediadores inflamatórios (citocinas) produzidos em tecidos periféricos “sinalizam” o SNC da presença de inflamação no organismo, por ação direta em áreas centrais ou por estimulação de aferências do nervo vago. Nas áreas centrais ocorre a integração dos sinais e desencadeamento da resposta inflamatória global, incluindo a ativação da via

erente do parassimpático, mediado pelo nervo vago. O nervo vago, cujo neurotransmissor é acetilcolina (via colinérgica) inerva vários componentes ou órgãos do sistema imunológico (sistema retículo endotelial), como linfonodos, fígado e baço. A ativação do vago leva a redução da produção de citocinas pelo baço de forma significativa, e como consequência uma redução intensa da resposta inflamatória. No reflexo inflamatório, o vago é o elemento mais importante no mecanismo eferente⁴⁰.

Dentre as vias de sinalização e as células envolvidas nesse processo, descreveu-se o importante papel dos macrófagos (resposta imunológica inata). Estudos em animais indicam que o neurotransmissor liberado pelo nervo vago, a acetilcolina, é capaz de inibir a produção de citocinas pelos macrófagos localizados no baço, ligando-se aos receptores do tipo nicotínico, mais especificamente, receptores α -7 nicotínicos. Ainda que ambos os receptores para acetilcolina, nicotínicos e muscarínicos, sejam encontrados nos macrófagos, somente os receptores α 7 nicotínicos exercem função relevante na via anti-inflamatória colinérgica⁴¹.

No que se refere ao neurotransmissor acetilcolina (Ach), investigações demonstraram que neste reflexo a Ach não era de origem neural, e sim oriunda de um subconjunto de linfócitos T presentes no baço. Desta forma temos uma fonte continua de Ach mesmo após algum tempo da cessão do estímulo e um mecanismo não neural para comunicação não neural do vago para o baço^{42,43}. Pode-se supor que a grande migração de linfócitos circundantes para o baço num quadro inflamatório⁴⁴ pode estar envolvida nesta via não neural. Sustentando esta teoria vemos que anatomicamente o vago tem grande

quantidade de projeções pós ganglionares para o trato gastrointestinal, que é rico em tecido linfoide secundário, apesar de não haver projeções para o baço⁴⁵.

Durante um estímulo elétrico do vago, as fibras vagais aferentes e eferentes estimulam um ou mais depósitos de linfócitos de origem gastrointestinal e do timo que são mobilizadas para o baço^{46,47}.

A importância da via anti-inflamatória colinérgica está se expandindo para modelos experimentais de doenças cardiovasculares, onde a resposta inflamatória está bem estabelecida^{48,49}. A estimulação colinérgica no modelo animal de injúria isquêmica/reperfusão miocárdica se associou a diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias TNFα e HMGB136 e promoveu redução da área de infarto e melhora de parâmetros funcionais do ventrículo esquerdo^{50,51}.

Portanto, após a reperfusão miocárdica, a “lesão residual” mediada por aumento do estresse oxidativo e liberação de citocinas pró inflamatórias, pode ser modulada pela ativação do Sistema Nervoso Autônomo (SNA).

1.5 Estimulação Colinérgica com Piridostigmina (PIR)

O brometo de piridostigmina (PIR) é um composto amônico quaternário que inibe a hidrólise de acetilcolina pela ligação reversível com a acetilcolinesterase, permitindo então que o neuromediador conservar-se por mais tempo na fenda sináptica. É clinicamente utilizado no tratamento de Miastenia Gravis, assim como na profilaxia contra a intoxicação por organofosforatos e como suposto tratamento para doença cardíaca⁵²⁻⁵⁴.

Com relação as suas ações cardiovasculares, existem evidências que a PIR reduz a frequência cardíaca, aumenta a função diastólica ventricular e reduz a dispersão do intervalo QT em indivíduos normais⁵⁵⁻⁵⁸. Ainda nesse sentido,

estudos experimentais realizados por nosso grupo, também demonstrou que o tratamento crônico com PIR, em ratos normotensos Wistar, submetidos a isquemia miocárdica crônica, apresentam redução da área de acinesia (maior que 80%), melhora das funções sistólica e diastólica, com normalização da pressão diastólica final e das derivadas de contração e relaxamento⁵⁹. Além desses resultados, nosso grupo também registrou a primeira evidência de que a estimulação vagal indireta modula o processo inflamatório no IAM por meio da mobilização de linfócitos T CD4 + e CD8 +, em especial, pelo aumento de linfócitos reguladores (Foxp3+)⁶¹.

Corroborando com nossos achados, Lataro (2011) utilizando o mesmo modelo experimental de IAM, em ratos normotensos Wistar, tratados cronicamente com PIR, observou o aumento do tônus vagal, sem alteração da frequência cardíaca intrínseca, melhora da sensibilidade barorreflexa, atenuação do remodelamento cardíaco e melhora da função sistólica do ventrículo esquerdo.

Diante dessas evidências, fica claro que a via anti-inflamatória colinérgica é um novo avanço terapêutico, visando à modulação da resposta inflamatória e controle na liberação de citocinas. E nesse sentido, a estimulação do nervo vago pode representar um novo caminho para modulação da produção de TNF e citocinas, evitando dessa forma uma exacerbação inflamatória.

Vale ressaltar que essas alterações estão bem documentadas em modelos experimentais desprovidos de uma patologia de base. Em contrapartida, na hipertensão essas modificações morfológicas associadas a inflamação são menos conhecidas e não existem informações sobre o papel da estimulação colinérgica no remodelamento ventricular e polarização de

macrófagos no miocárdio, principalmente quando associada a comorbidades, como IAM. Ficando claro a importância de se investigar, na hipertensão a influência da estimulação vagal nas adaptações cardíacas e inflamatórias. O que por sua vez, poderá nos trazer uma melhor compreensão dessas respostas e novas estratégias terapêuticas.

1.6 Modelo experimental de HAS e IAM

Neste trabalho, utilizamos um modelo genético de hipertensão espontânea (SHR) em ratos que apresenta respostas hemodinâmicas, neurais, vasculares e lesões de órgãos-alvo semelhantes à hipertensão primária humana⁶²⁻⁶⁴. Esse modelo foi desenvolvido por Okamoto e Aoki (1963) através de retrocruzamento envolvendo irmãos e irmãs de ratos da linhagem Wistar Kyoto que apresentavam pressão arterial elevada, resultando em animais naturalmente hipertensos em 100 % dos seus descendentes⁶⁵. A partir de então, o modelo SHR é amplamente utilizado e considerado uma excelente ferramenta para estudo da história natural, determinantes genéticos e alterações fisiopatológicas da hipertensão arterial⁶⁶.

A insuficiência cardíaca em animais de experimentação, induzida pelo IAM por ligadura da artéria coronária, também vem sendo bastante utilizada por vários pesquisadores que visam uma melhor compreensão da evolução do IAM e suas complicações⁶⁷. Devido a sua importante relevância em pesquisas experimentais e relativa facilidade metodológica, a indução do IAM em ratos SHRs, torna-se um modelo interessante para se investigar a resposta neuroimunomoduladora na fase subaguda pós isquemia miocárdica.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que a resposta inflamatória é um importante mecanismo no remodelamento ventricular pós IAM, a busca de terapêuticas que visem modular os mecanismos inflamatórios, deverá iniciar uma nova era na prevenção da insuficiência cardíaca após eventos isquêmicos do miocárdio.

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. Diante deste cenário, realizamos um estudo que visa investigar como a neuroimunomudalação pode agir sobre o grau de ativação da polarização de macrófagos na área isquêmica do miocárdio em ratos SHR.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da estimulação parassimpática, por meio da administração do antagonista farmacológico da acetilcolinesterase (brometo de piridostigmina), sobre o remodelamento ventricular e a polarização de macrófagos na fase subaguda do infarto do miocárdio em ratos SHR.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar no 7º dia pós IAM em ratos SHR e Wistar, tratados com PIR e sem tratamento, os seguintes parâmetros:

- Avaliação no 7º dia pós IAM em ratos SHR, nos grupos SHAM (CS), infarto + medicação (IP) e infarto (IC) a influência de forma positiva e consequências do padrão de remodelamento e função ventricular em ratos tratados com PIR e sem tratamento.
- Hemodinâmicos (pressão arterial e frequência cardíaca) e a variabilidade da frequência cardíaca.
- Parâmetros morfológicos do coração meio do exame de ecoDopplercardiograma.
- Quantificação de macrófagos (Total e M2) no tecido cardíaco por meio da técnica de imunohistoquímica.
- Análises quantitativa das fibras de colágeno no tecido cardíaco.
- Análise morfológica do coração.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Sequência Experimental

Para a realização deste estudo foram utilizados 40 ratos da linhagem SHR, machos, provenientes do biotério da Universidade de São Paulo. Água e ração (Nuvilab da marca Nuvital, peletizada) foram oferecidas de modo irrestrito, dieta normoprotéica (12% de proteínas), com controle de temperatura (22 a 24 C°) e luminosidade (12h de claro e 12h de escuro). O manejo dos animais foi de acordo com os princípios éticos da experimentação animal da Sociedade Brasileira da Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA). Comitê de ética Nº AN0019.2014.

O brometo de piridostigmina (sigma) foi administrado aos animais na concentração de 0,2 mg/ml e na dose de 40 mg/kg/dia, conforme protocolo prévio de nosso laboratório.

A fase experimental foi iniciada quando os animais completaram 12 a 16 semanas, na qual a hipertensão começa a se bem estabelecida no modelo SHR. A partir de então, os animais foram pesados e divididos de forma aleatória da seguinte forma: Infarto + Medicação (Piridostigmina) (IP), Infarto (IC) e SHAM (CS). Foi realizada a sequência experimental ilustrada abaixo (Fig. 1).

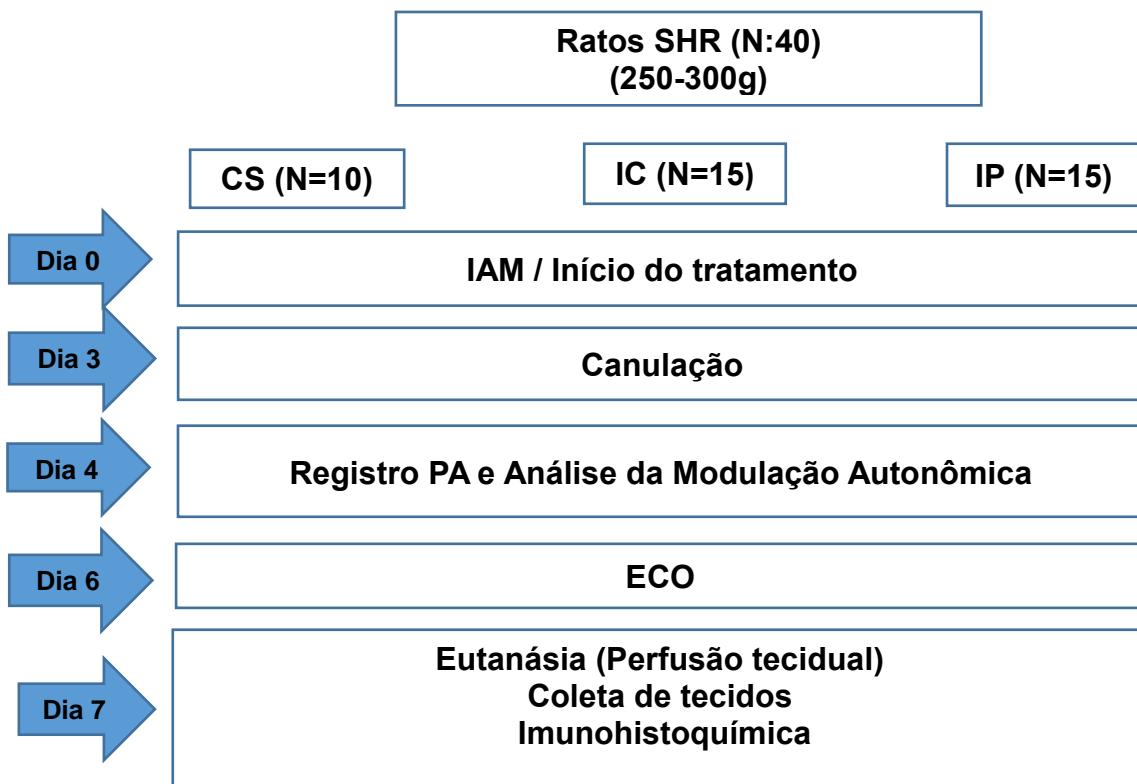


Figura1. Desenho Experimental

5.2 Modelo Experimental (IAM)

Os animais foram pesados e anestesiados com uma mistura de Ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (12mg/kg) por via intraperitoneal e colocados em decúbito dorsal e entubados (Gelko-14G). Um pequeno corte foi realizado na pele e os músculos peitorais afastados. Os animais foram submetidos a respiração artificial e realizada uma toracotomia esquerda no 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 10ml. Logo

após, o animal foi retirado da ventilação artificial e estimulada a respiração. Os músculos afastados foram reposicionados pela pele suturada (fio mononylon 4.0). Os animais receberam 30000 UI de benzi penicilina benzatina (Penretard, Cibran, Tanquá, RJ, Brasil, i.m.) e colocados em ambiente aquecido para recuperação.

5.3 Canulação

Os animais foram anestesiados com ketamina (80 mg.kg) e xilazina (12 mg.kg) e submetidos a colocação de cateter de polietileno (PE-10, com diâmetro interno de 0,01 mm que foi conectado ao PE-50, com diâmetro interno de 0,05 mm). A cânula foi preenchida com soro fisiológico, e posicionadas no interior da aorta abdominal, através da artéria femoral esquerda para registro de pressão arterial e frequência cardíaca. Através de uma pequena incisão na região inguinal esquerda em direção ao feixe vasculo-nervoso, a extremidade da cânula com menor calibre (PE-10) foram introduzidas na artéria femoral.

A cânula foi fixada com fio de algodão na artéria, sua extremidade mais calibrosas foi passada subcutâneamente, exteriorizadas no dorso da região cervical e fixada com fio de algodão na pele. Cada rato foi mantido em uma caixa (Plexiglas, 25x15x10 cm) durante a realização do experimento. Após o término da cirurgia os animais foram tratados com uma única injeção de penicilina (Benzetacil1, Fontoura-Wyeth, 60.000 U).

5.4 Registros de pressão arterial

Vinte e quatro horas após a canulação, com o animal acordado, 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. Esta extensão foi conectada a um transdutor eletromagnético (Kent Instruments, EUA) que, por sua vez, foi conectado a um pré-amplificador (Stemtech BPMT-2 Quintron Instrumnet Inc, EUA). Sinais de PA foram gravados durante um período de 30 minutos em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (Windaq, 2Kz, DATAQ Instruments, EUA), permitindo análise dos pulsos de pressão, batimento-a-batimento, com uma frequência de amostragem de 2000 Hz por canal, para estudo dos valores de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) (Fig. 2). Os valores de FC foram determinados a partir do intervalo entre dois picos sistólicos. As planilhas de dados obtidas foram analisadas em programa comercial para análise (Excel 10.0), onde se calcularam a média e o desvio padrão da PAM, PAS, PAD e FC para cada animal. Os valores de cada variável foram calculados, utilizando-se a média dos desvios padrões de cada animal estudado.

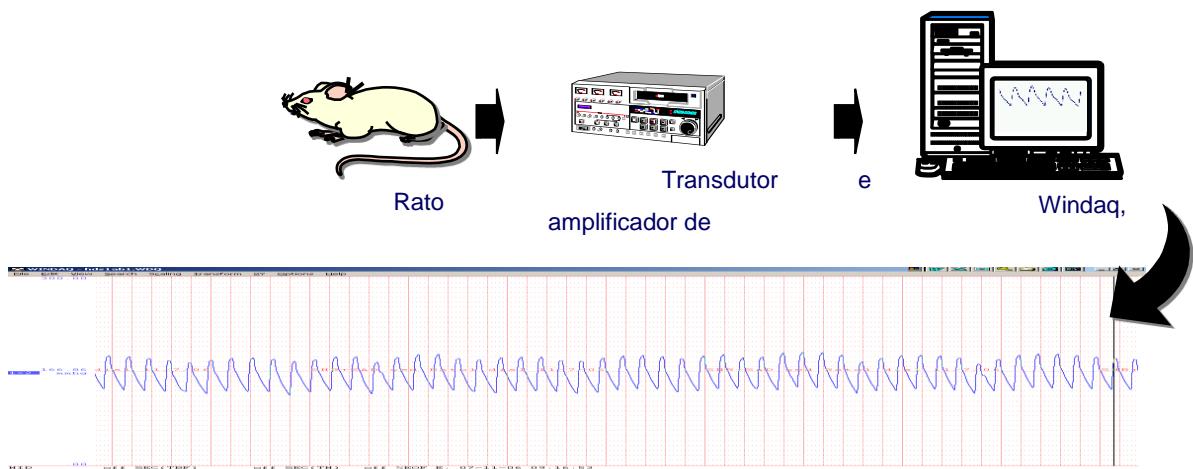


Figura 2. Esquema do sistema de registro de pressão arterial. (Desenho: S. Lacchini modificado).

5.5 Modulação Autonômica Cardiovascular

Os parâmetros para análise no domínio do tempo consistiram em calcular os valores médios do intervalo de pulso e PAS. A variabilidade desses parâmetros foi quantificada pela variância (IP e PAS).

Para análise no domínio da frequência, a potência foi obtida usando o método do Periodograma de Welch em séries de 16384 pontos das séries temporais decimadas de intervalo de pulso e PA, com uma janela Hanning de 512 pontos e com 50% de sobreposição (MATLAB 6.0, Mathworks, Inc). As potências para as bandas muito baixa (MBF, 0,0-0,20 Hz; modulação humorai), baixa (LF, 0,20-0,75 Hz; modulação simpática) e alta (HF, 0,75-4,0 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 MBF⁶⁸.

5.6 Avaliações da área infartada por Ecodopplercardiografia

O exame ecocardiográfico foi realizado para a quantificação da área infartada e avaliação da função ventricular.

Após anestesia com uma solução intraperitoneal Ketamina (80 mg/kg) e Xilazina (12mg/kg), os animais tiveram a região torácica devidamente tricotomizada e foram mantidos em decúbito lateral para a realização do exame no aparelho SEQUOIA 512 (ACUSON, Corporation, Mountain View, CA-EUA), com transdutor linear multifrequêncial (10-14mHz), que permite imagens

bidimensional e monodimensional simultâneas, além da análise de fluxo por efeito Doppler espectral eletrocardiográfico, mediante a colocação de três eletrodos para a derivação DII. A profundidade de imagem trabalhada foi de 02 cm.

Foram utilizadas as janelas longitudinais paraesternal direita para obtenção dos cortes longitudinal e transversal e a longitudinal paraesternal esquerda para a obtenção dos cortes apical (duas, quatro e cinco câmaras). As medidas lineares foram realizadas nas imagens obtidas pelo modo-M⁶⁹. Foram feitas medidas de área e eixo longitudinal do VE. Tais medidas morfométricas, foram fornecidas pelo Modo-M, sempre guiado pelo modo bidimensional⁷⁰.

A função sistólica foi avaliada pela fração de ejeção (FE%) pelo método Simpson modificado, por se mostrar mais fidedigno em corações infartados e pela velocidade de encurtamento circunferencial (VEC-circ/seg), cujas fórmulas estão a seguir.

Simpson modificado: $v = \left(\frac{\pi}{4}\right) \sum_{i=1}^{20} a_i b_i x \left(\frac{L}{20}\right)$, onde L = comprimento do ventrículo esquerdo dividido em 20 discos (i= 1 a i= 20) da base ao ápice, com o diâmetro de cada disco determinado em duas visões apicais (a e b). Com este procedimento feito tanto na diástole como na sístole, obtivemos os respectivos volumes (diastólico e sistólico), o que permitiu o cálculo da fração de ejeção: FE = (volume diastólico final – volume sistólico final / volume diastólico final) x 100%. Desta maneira também obtivemos as medidas do comprimento do ventrículo, assim como a área do mesmo.

$VEC = \frac{(VEDIA - VESIS)}{(VEDIA * TE)}$, onde TE = tempo de ejeção. A função diastólica foi avaliada utilizando-se os índices derivados da curva de velocidade de fluxo diastólico mitral e do fluxo sistólico da via de saída do ventrículo esquerdo

obtidos pela técnica de Doppler pulsátil. A curva de velocidade do fluxo diastólico foi obtida a partir da imagem apical quatro câmaras, posicionando-se o aparelho próximo à face ventricular da valva mitral. Foram determinadas: relação E/A - razão entre a velocidade máxima da onda E e a velocidade máxima da onda A, tempo de desaceleração da onda E (DESAC E) tempo em milissegundos (ms) entre o pico da onda E e o ponto em que a rampa de desaceleração intercepta a linha de base da curva de velocidade do fluxo diastólico mitral. A curva de velocidade dos fluxos para análise do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) foi obtida posicionando-se o volume amostra numa posição intermediária entre a valva mitral e a via de saída do ventrículo esquerdo. Foi determinado o TRIV em ms, entre o final do fluxo sistólico na via de saída do ventrículo esquerdo e o início do fluxo diastólico mitral. O DESAC E e o TRIV, posteriormente corrigidos pela frequência cardíaca (DESAC ECORR e TRIVCORR), dividindo-se seus valores pela raiz quadrada dos respectivos intervalos R-R.

Entretanto, além das avaliações das funções sistólica e diastólica em separado, foi utilizado outro método de avaliação funcional combinado, o índice de desempenho miocárdico (IPM), derivado de intervalos obtidos pelo Doppler pulsátil, validado para ratos e camundongos⁷¹. Todas as medidas seguiram as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia.

5.7 Eutanásia e coleta dos tecidos

A eutanásia dos animais foi realizada por dose letal de anestésico, os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina para a realização da perfusão cardíaca. 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, o animal

foi perfundido com formol 4% tamponado por mais 10 a 15 minutos. Procedimento obedecendo os princípios éticos da experimentação animal.

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

5.8 Análise Histopatológica da Área do infarto e Processamento Histológico

A preparação histológica do coração se deu após anestesia letal e perfusão conforme descrito anteriormente.

Os fragmentos após fixação foram processados histologicamente. Estes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluído em blocos de Paraplast ® (Leica, Germany). Cada bloco conteve 2 cortes, foram realizados cortes transversais na porção média do ventrículo esquerdo, na altura dos músculos papilares, com espessura de 03 µm. Para posterior confecção das lâminas, o material seccionado seguiu o protocolo de desparafinização em xilol, hidratação em concentrações decrescentes em etanol e hidratação em água filtrada. Após a coloração, a desidratação ocorreu em concentrações crescentes de etanol, diafanização em xilóis e montagem em meio de resina Permount ® (Fisher Scientific, Fair Law, New Jersey, USA).

Para a caracterização morfológica do tecido cardíaco foi utilizado coloração com hematoxilina e eosina (HE) (Fig.3).

As lâminas foram examinadas com microscópio óptico (Axiolab, Carl Zeiss Inc, Germany). Todas as análises foram efetuadas de forma cega, ou seja, o pesquisador não soube qual grupo experimental estava sendo avaliado.

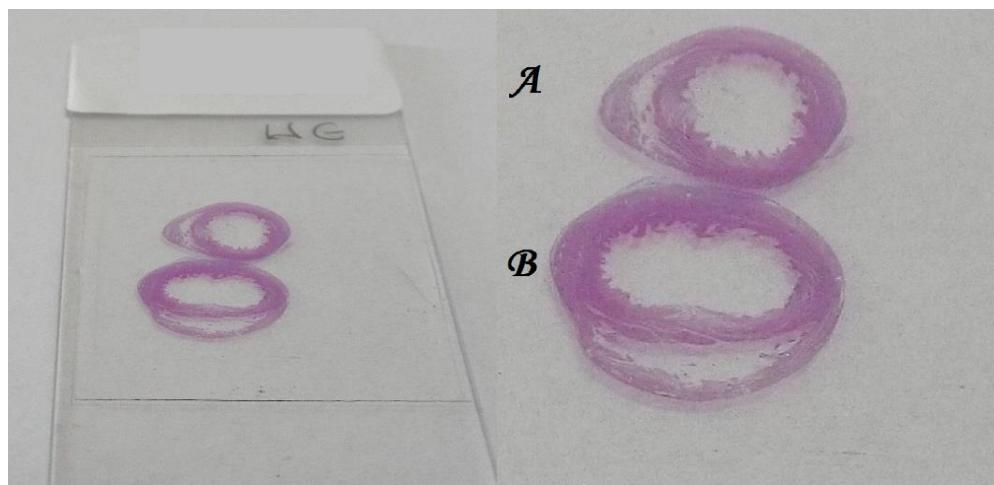


Figura 3. Lâminas coradas com HE.

5.9 Avaliações da expressão de macrófagos na área do IAM por meio da imunohistoquímica

Para a imunohistoquímica utilizou-se 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 (Fig. 4).

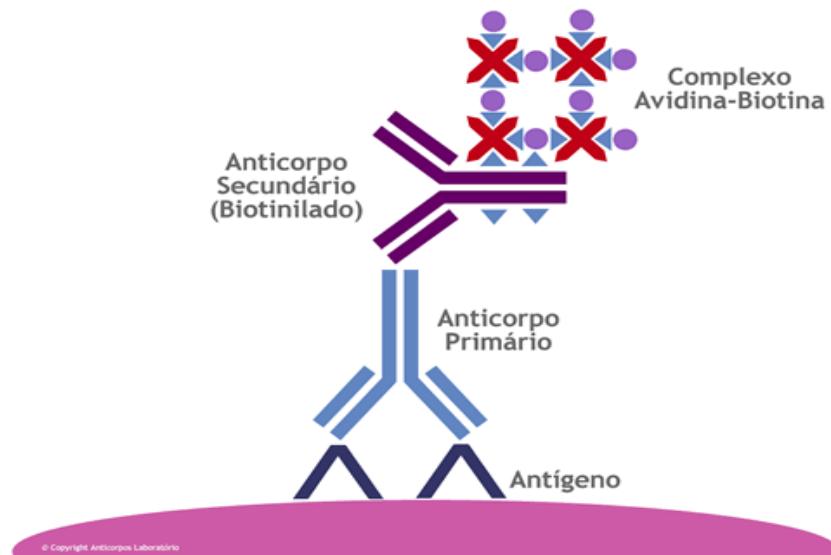


Figura 4. Método indireto de Imunohistoquímica pelo complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (retirada do site <http://www.anticorpos.com.br/exames/imuno-histoquimica.aspx> cessado em 09/10/2014).

Para a desparafinização, as lâminas sinalizadas foram deixadas na estufa de 60 a 65° C por 30 minutos, retiradas e imersas em xanol quente por 5 minutos, resfriadas com 3 banhos de xanol 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 lâminas em água oxigenada de 20 volumes/ metanol por 10 minutos repetidos por 3 vezes, em seguida lavado sequencialmente em água corrente, água destilada e tampões de lavagem PBS (tampão fosfato salino) 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 (anticorpo Anti-CD68 antibody ab31630) e CD2061:1000 (anticorpo Anti-Mannose Receptor antibody ab8918). As lâminas foram secas ao redor dos cortes e colocadas em câmera úmida, e pipetadas os anticorpos individualmente e diluídos sobre os cortes, e incubados em câmera úmida em geladeira durante a noite. A seguir, foram lavadas com PBS ou TBS por 03 minutos, incubadas em câmera úmida com anticorpos secundários (Histofine – anti- mouse and rabbit- 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 inespecíficas. Após esta seleção, foi realizada a quantificação das células individualmente através da marcação pelo software específico programa de domínio público ImageJ® versão 1.48v 17 (Fig. 5).

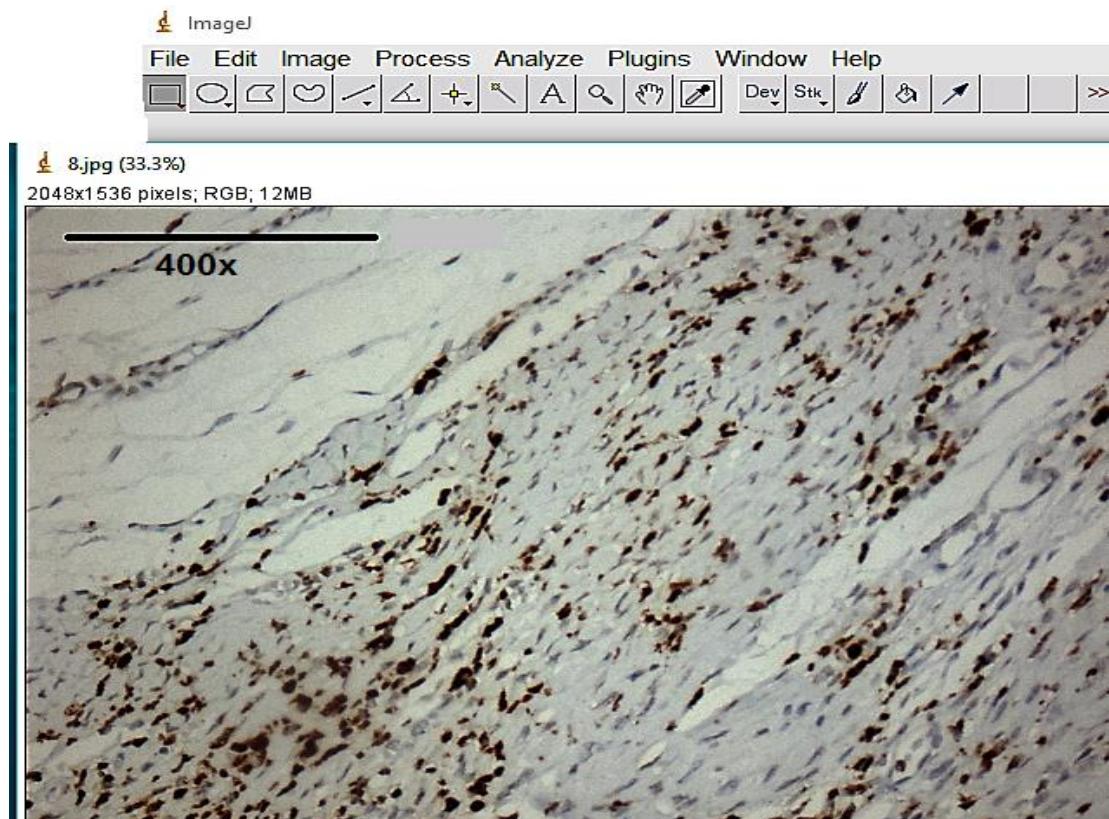


Figura 5. Imagem no programa ImageJ para contagem das células.

5.10 Avaliações do tamanho do infarto

Para as avaliações morfometrias foram utilizadas fotos obtidas com o uso de uma câmera digital Fujifilm de 7,2 Mp. As fotos apresentavam 1280 x 960 pixels de dimensões e cerca de 600 kb. Para o cálculo do tamanho de infarto foi utilizado apenas o corte transversal e o programa Image J (NIH, EUA).

O infarto foi definido como correspondendo à região da parede ventricular esquerda, entre as bordas externas e internas, onde foi identificado a presença de infiltrado de células inflamatórias e áreas de cicatrização. O tamanho do infarto foi estimado calculando-se a porcentagem de área acometida em relação a área total da parede ventricular. O infarto externo foi calculado pela razão percentual entre o comprimento da superfície epicárdica com infarto e o comprimento total da superfície epicárdica do ventrículo esquerdo. O infarto

interno foi calculado pela razão percentual entre o comprimento da superfície endocárdica com infarto e o comprimento total da superfície endocárdica do ventrículo esquerdo⁷².



Figura 6. Mensuração do tamanho do infarto: PE IAM (perímetro externo do infarto), PI IAM (perímetro interno do infarto), AE VE (área externa do ventrículo esquerdo), AI VE (área interna do ventrículo esquerdo).

$$\text{Área do infarto (\%)} = \frac{\frac{\text{PE IAM} + \text{PI IAM}}{2}}{\frac{\text{AE VE} + \text{AI VE}}{2}} \times 100$$

Figura 7. Fórmula para cálculo da área de infarto.

5.11 Análises quantitativa das fibras colágenas

Cortes adicionais foram corados com Picrosirius Red (Sigma, St. Louis, MO, EUA), seguindo o método descrito por JUNQUEIRA et al.⁷³ e foram examinados com auxílio de microscópio de luz polarizada Pol-Interferencial Photomicroscope (Modelo 61282, Carl Zeiss, Alemanha). As imagens também foram analisadas pelo programa Image J (National Institute of Health - NIH, EUA), no qual a área relativa ocupada pelas fibras colágenas foi calculada em relação à área total do corte, conforme descrito por HADI et al⁷⁴.

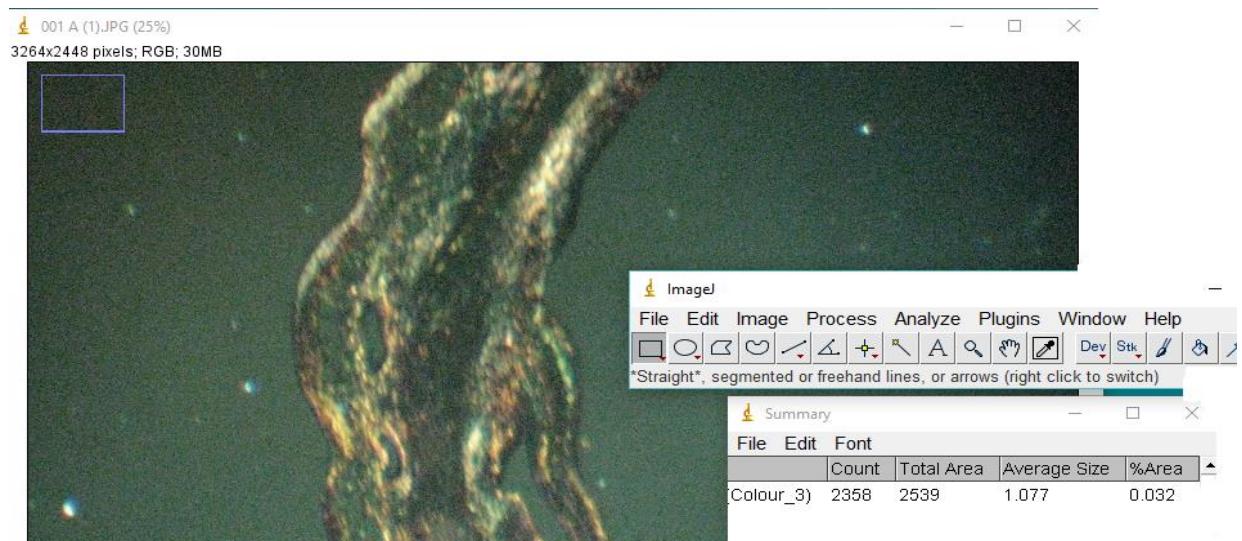


Figura 8. Contagem de colágeno % área.

6. ANÁLISE DOS DADOS

Os valores dos grupos, para cada parâmetro avaliado, foram apresentados como média \pm erro padrão da média. Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) multifatorial, usando o programa GraphPad Prism com teste Bonferroni, sendo que $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

7. RESULTADOS

7.1 Composição Corporal

A tabela 1, ilustra o peso corporal inicial dos animais hipertensos estudados com idade de 12 a 16 semanas. Os grupos IC e IP apresentaram os pesos estatisticamente maiores em relação ao grupo CS.

Tabela 1. Peso corporal inicial dos animais estudados.

	CS (N=10)	IC (N=15)	IP (N=15)	P
Peso	275 ± 12	296 ± 12	283 ± 14	0,001

Grupo controle: CS: Controle, IC: Infarto controle e IP: Infarto Piridostigmina. Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média. ANOVA-one way post hoc bonferroni (* p≤0,05).

7.2 Curva de mortalidade

De acordo com a curva de mortalidade (Fig.9), podemos observar que os animais infartados sem tratamento (N inicial= 15) apresentaram maior índice de mortalidade do primeiro ao terceiro dia pós IAM (N final= 10). Os animais infartados tratados com PIR (N inicial= 15) apresentaram uma mortalidade mais tardia (N final= 11), evidenciada a partir do terceiro ao sexto dia. Não foram observados óbitos no grupo SHAM (CS) (N inicial e final= 10).

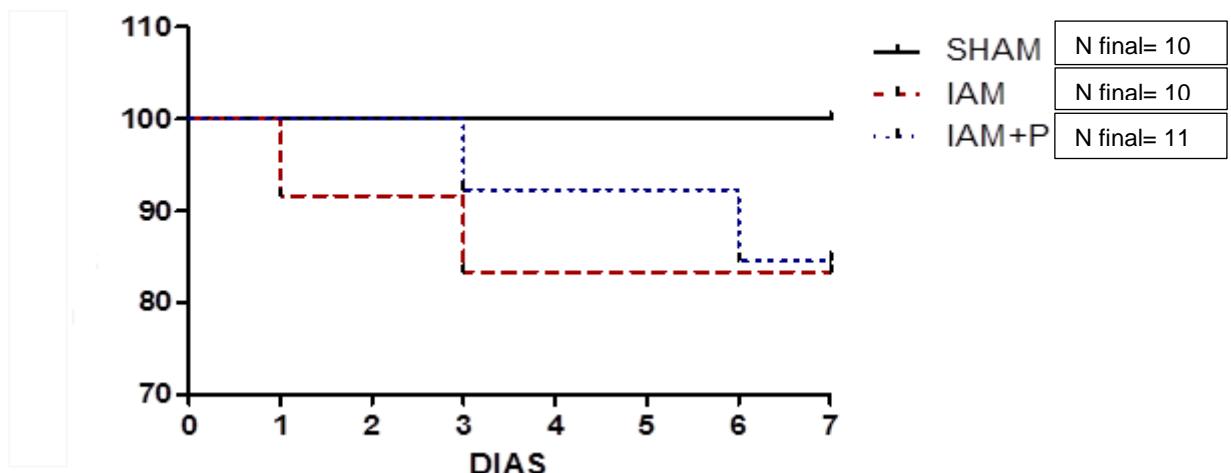


Figura 9. Curva de mortalidade dos animais SHR

7.3 Análises da Variabilidade da Pressão Arterial e Frequência cardíaca

As avaliações hemodinâmicas constaram dos registros da PAS, PAD, PAM e FC. Na tabela 2, a PAS foi estatisticamente menor quando comparamos o grupo IP (163 ± 8 mmHg) e IC (157 ± 5 mmHg) com o grupo CS (201 ± 8 mmHg). A PAD também apresentou o mesmo comportamento no grupo IP (118 ± 6 mmHg) e grupo IC (116 ± 3 mmHg) quando comparado com o grupo CS (145 ± 6 mmHg). A PAM foi menor no grupo IP (139 ± 7 mmHg) e IC (136 ± 4 mmHg) comparado com o CS (172 ± 6 mmHg). A FC não foi diferente entre os grupos.

Tabela 2. Valores representativos das variáveis hemodinâmicas dos grupos estudados.

Variáveis	Grupos			P
	CS (N=10)	IC (N=10)	IP (N=11)	
PAS (mmHg)	201 ± 8	157±5§	163 ±8*	0,0057
PAD (mmHg)	145 ± 6	116±3§	118±6*	0,0001
PAM (mmHg)	172±6	136±4§	139±7*	0,0001
FC (bpm)	352 ± 15	339±10	344 ± 16	0,0820

PAS: Pressão arterial sistólica, PAD: Pressão arterial diastólica e PAM: Pressão arterial média, FC: Frequência cardíaca. Os dados representam média ± erro padrão; CS = Controle SHAM. IC = Infartado controle; IP = Infartado tratado; *p<0,05 IP vs CS. #p<0,05 IP vs IC. § p<0,05 IC vs CS. ANOVA-one way post hoc bonferroni.

Na análise da variabilidade no domínio da frequência, o %LF, importante indicador da modulação simpática cardíaca, foi estatisticamente menor quando comparamos os grupos IP ($21,90 \pm 3,29\%$) e IC ($18,80 \pm 2,28\%$) com o grupo CS ($19,60 \pm 2,79\%$). Da mesma forma, ao avaliarmos o HF%, indicador de modulação da atividade parassimpática cardíaca, observamos uma redução que não foi estatisticamente significante no grupo IP ($78,10 \pm 3,29\%$) quando comparado com os grupos CS ($80,40 \pm 2,79\%$) e IC ($81,20 \pm 2,28\%$).

A relação LF/HF, que reflete o equilíbrio simpático-vagal global, no grupo IP apresenta-se elevada ($0,34 \pm 0,08$) quando comparada aos grupos CS ($0,29 \pm 0,06$) e IC ($0,27 \pm 0,04$).

Tabela 3. Variabilidade do intervalo de pulso no domínio do tempo e da frequência dos grupos hipertensos, controle SHAM (CS), infartados controle (IC) e infartado tratado com PIR (IP).

	CS (N=10)	IC (N=10)	IP (N=11)	P
Pressão arterial sistólica				
VARPAS (mmHg ²)	10,10 ± 0,46	6,85± 0,61§	5,89± 0,54 *	0,0015
LF Abs (mmHg2)	16,31± 2,32	5,15± 1,50§	5,40± 1,63 *	0,0273
Domínio do tempo				
SDNN (ms)	13,63± 1	14,35± 1,39	13,17± 1,81	0,2000
RMSSD (ms)	9,87± 0,82	9,69± 0,96	9,64± 1,67	0,9050
Domínio da frequência				
LF nu (%)	19,60± 2,79	18,80± 2,28	21,90 ± 3,29	0,4908
HF nu (%)	80,40± 2,79	81,20± 2,28	78,10± 3,29	0,7239
LF/HF	0,29± 0,06	0,27± 0,04	0,34± 0,08	0,7033

VARPAS: Variância da PAS; LF Abs:Componente de baixa frequência em unidades absolutas. SDNN: Desvio padrão de valores sucessivos. RMSSD: Raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças entre os sucessivos valores de intervalo de pulso. LF nu: Baixa frequência normalizada. HF nu: Alta frequência normalizada. LF/HF: Balanço autonômico. Apresentados em média dos valores ± erro padrão. ANOVA-one way post hoc bonferroni. *p<0,05 IP vs CS. #p<0,05 IP vs IC. § p<0,05 IC vs CS.

7.4 Análise Ecocardiográfica

As análises ecocardiográficas, apresentados na Tabela 4, foi observado a presença de áreas de hipo/acinesia no ventrículo esquerdo, de moderada a grande extensão, em ambos os grupos que sofreram ligadura da artéria coronária esquerda (IC e IP). Associada a essas alterações, podemos observar que houve redução significativa na fração de ejeção do ventrículo esquerdo dos grupos infartados quando comparados ao grupo controle SHAM (CS).

Entretanto o brometo de PIR (IP) foi capaz de melhorar a função sistólica em dois parâmetros, fração de ejeção e fração de encurtamento, em relação ao grupo IC. A função diastólica, avaliada através da relação E/A e do TRIV, apesar de não observarmos diferenças estatisticamente significantes entre os grupos IP e IC, foi evidenciado um aumento nos valores da E/A e TRIV no grupo IP (Tabela 4).

Tabela 4: Dados ecocardiográficos avaliados sete dias após o IAM

Variáveis	SHAM (N=10)	IC (N=10)	IP (N=11)	P
Área acinética ou hipocinética do VE	-	0,172± 0,02	0,180 ± 0,06	0,9097
% Área de IAM	-	0,366 ± 0,03	0,350 ± 0,41	0,6842
Área total do VE	-	0,492 ± 0,03	0,470 ± 0,05	0,8205
AE (cm)	0,32 ± 0,02	0,40 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,4360
LVDIA	0,61 ± 0,03	0,64 ± 0,03	0,68 ± 0,04	0,9392
LVSIS	0,32 ± 0,03	0,44 ± 0,02	0,43 ± 0,03	0,0539
LV(%)FS	46,68 ± 2,10	30,69± 0,63	35,64 ± 2,56#	0,0001
FE SIMPSON	0,83 ± 0,02	0,64 ± 0,01	0,71 ± 0,03#	0,0001
Relação E/A	2,16 ± 0,18	3,07 ± 0,35	1,67 ± 0,24	0,0075
TRIV(ms)	25 ± 1,43	20 ± 1,33	27,50 ± 2,49	0,2785
IPM	0,50 ± 0,05	0,65 ± 0,13	0,43 ± 0,10	0,1634
FC	267 ± 17,99	270 ± 14,3	242 ± 15,86	0,2785
DC	50 ± 3,22	32 ± 4,12	39 ± 5,07	0,2191

AE: Átrio esquerdo, LVDIA: cavidade do ventrículo esquerdo na diástole, LVSIS: cavidade do ventrículo esquerdo na sístole, LV(%) FS: fração de encurtamento,

FE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo, Relação E/A: relação dos índices de velocidade de relaxamento rápido e tardio do ventrículo esquerdo, TRIV: enchimento isovolumétrico ventricular, IPM: índice de performance miocárdica, FC: frequência cardíaca, DC: débito cardíaco, VE: ventrículo esquerdo. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. Para análise dos dados, foi utilizado ANOVA- one way post hoc bonferroni. #p<0,05 IP vs IC.

7.5 Imunohistoquímica do coração

Para cada animal foram preparados cortes histológicos para marcação do receptor de membrana para detecção específica do macrófago total (CD 68) e CD 206 para detecção de macrófago tipo M2. Foram utilizadas de 6/7 lâminas por grupo.

Macrófagos total (CD68+)

A marcação dos macrófagos total (CD68+) foi realizada pelo programa de análise de imagens Image J® versão 1.48v 17 (free software, NIH, Bethesda, Maryland, EUA) que quantificou em pixel as áreas castanhas, reveladas pela diaminobenzidina.

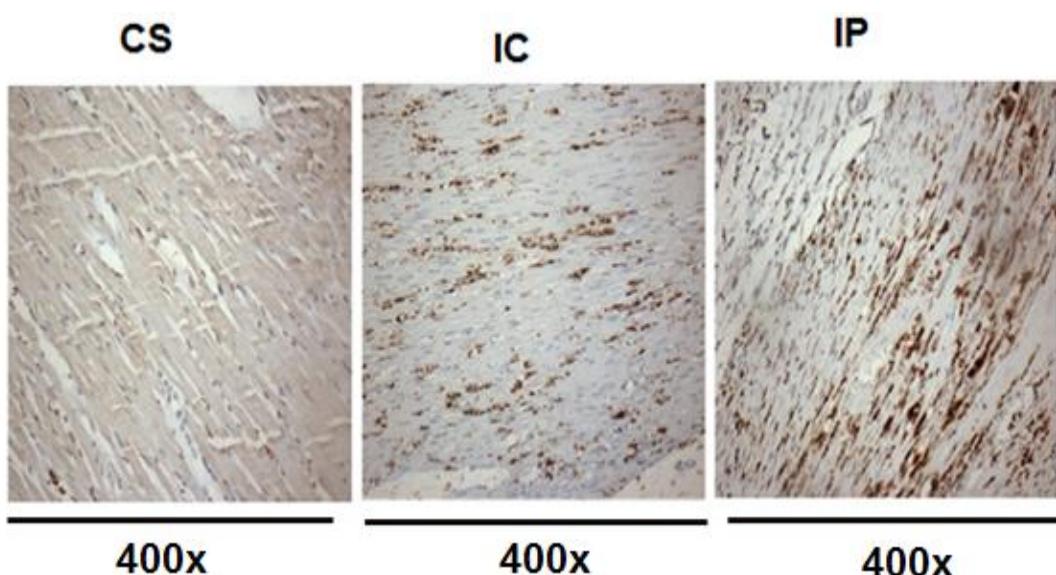


Figura 10. Marcação dos macrófagos total

Ao avaliarmos a marcação dos macrófagos total, observamos uma quantidade aumentada no grupo IP (126 ± 20) comparado ao grupo IC (114 ± 7). Conforme podemos observar na figura baixo (Fig.11).

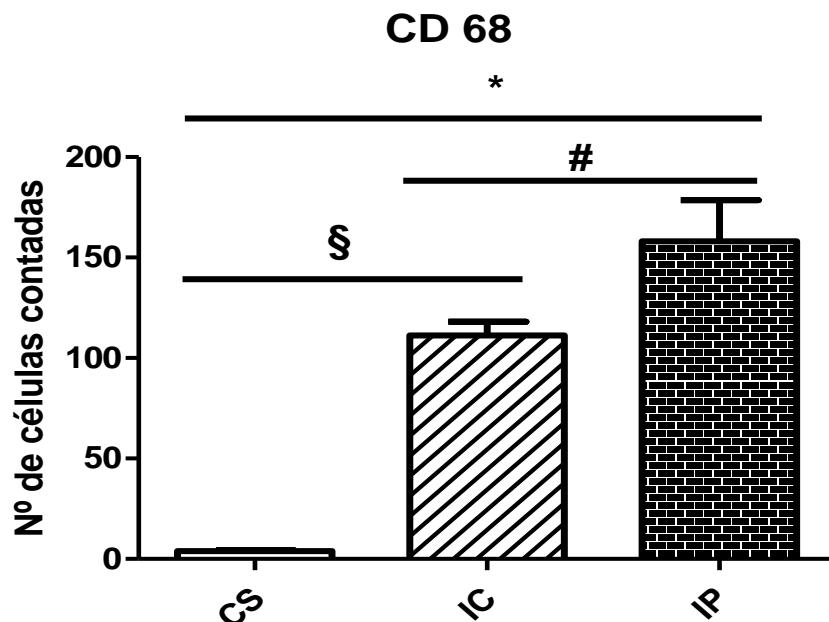


Figura 11. Quantificação de Macrófagos total no tecido cardíaco dos grupos (CS, IC e IP). Dados apresentados em média dos valores \pm erro padrão. ANOVA-one way post hoc bonferroni * $p<0,05$ IP vs CS. § $p<0,05$ IC vs CS. # $p<0,05$ IP vs IC.

Os macrófagos totais 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 total, no grupo tratado (IP) quando comparado com o grupo infartado controle (IC) (Fig.12).

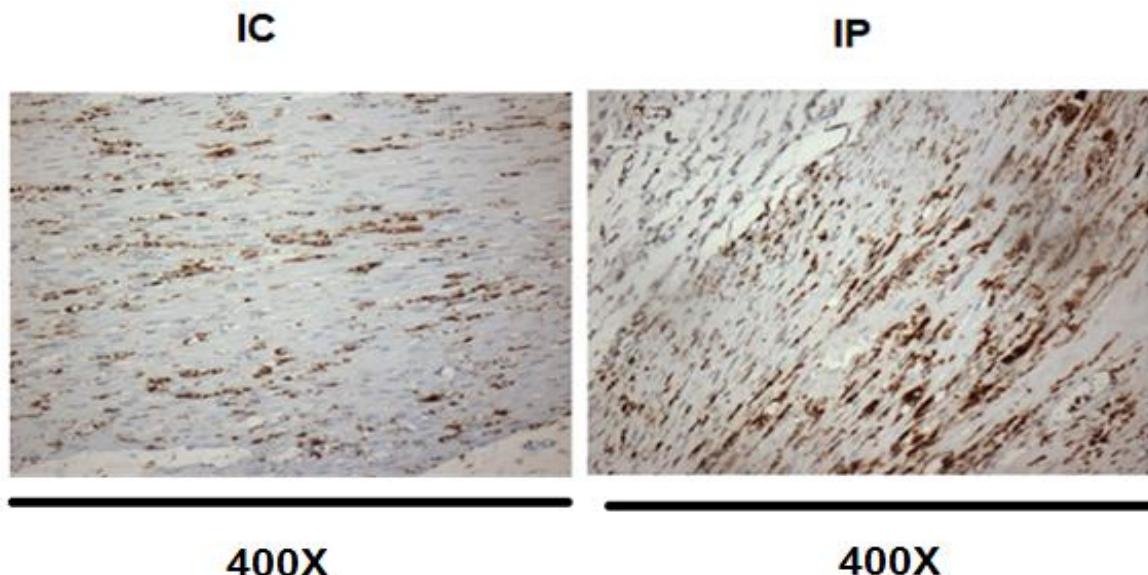


Figura 12. Padrão observado de distribuição de infiltrado de macrófagos totais no tecido cardíaco.

Macrófagos tipo M2 (CD206+)

A marcação dos macrófagos M2, foi observada pela presença do receptor para manose (CD206+), que é uma glicoproteína transmembrana, incluída na família de receptores de reconhecimento padrões que é de fundamental importância na defesa do organismo.

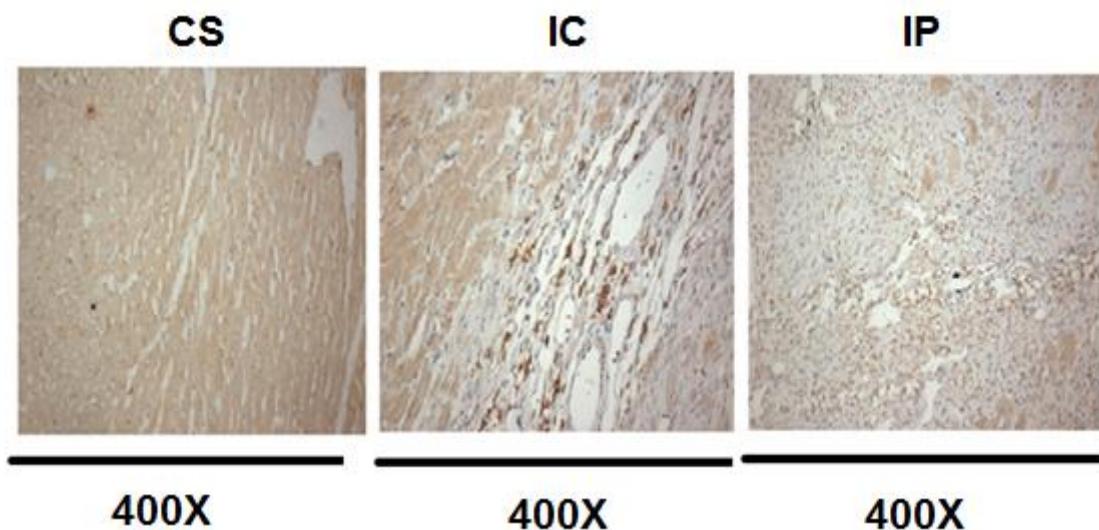


Figura 13: Marcação dos macrófagos M2

Ao avaliarmos a polarização dos macrófagos do tipo M2, foi observado diferença quando comparamos IC (50 ± 4) e IP (67 ± 7) vs CS ($2 \pm 0,4$) conforme podemos observar na figura baixo (Fig. 14).

Evidenciando que o infarto aumenta a quantidade de macrófago M2, os quais são responsáveis diretos pelo remodelamento e reparo tecidual.

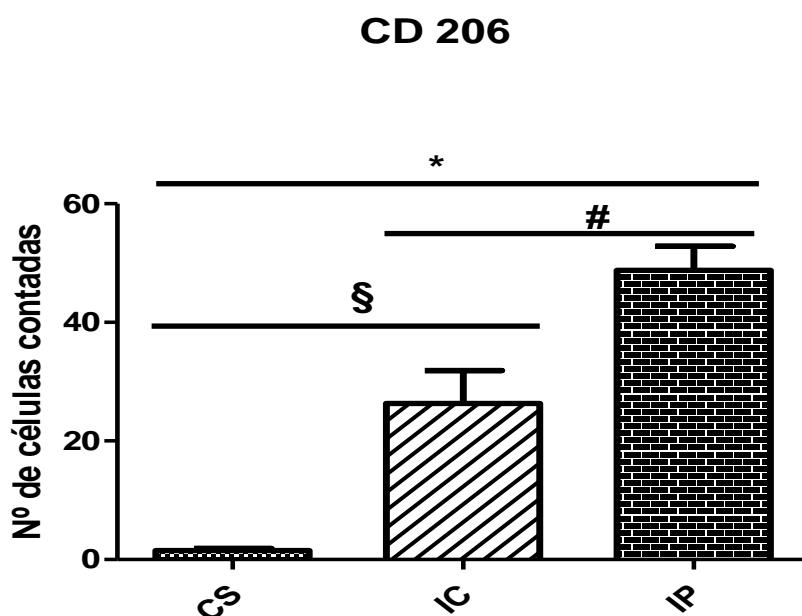


Figura 14: Quantificação de Macrófagos M2 no tecido cardíaco do rato SHR (CS, IC e IP). Dados apresentados em média dos valores \pm erro padrão. ANOVA-one way post hoc bonferroni *p<0,05 IP vs CS. § p<0,05 IC vs CS. # p<0,05 IP vs IC.

7.6 Avaliações da área do infarto

Na figura 15, podemos observar o tamanho do infarto avaliados das seguintes formas: perímetro externo do infarto, perímetro interno do infarto, área externa do ventrículo esquerdo e área interna do ventrículo esquerdo. Não foram observadas diferenças estatisticamente significante entre os grupos nas diferentes análises da área infartada.

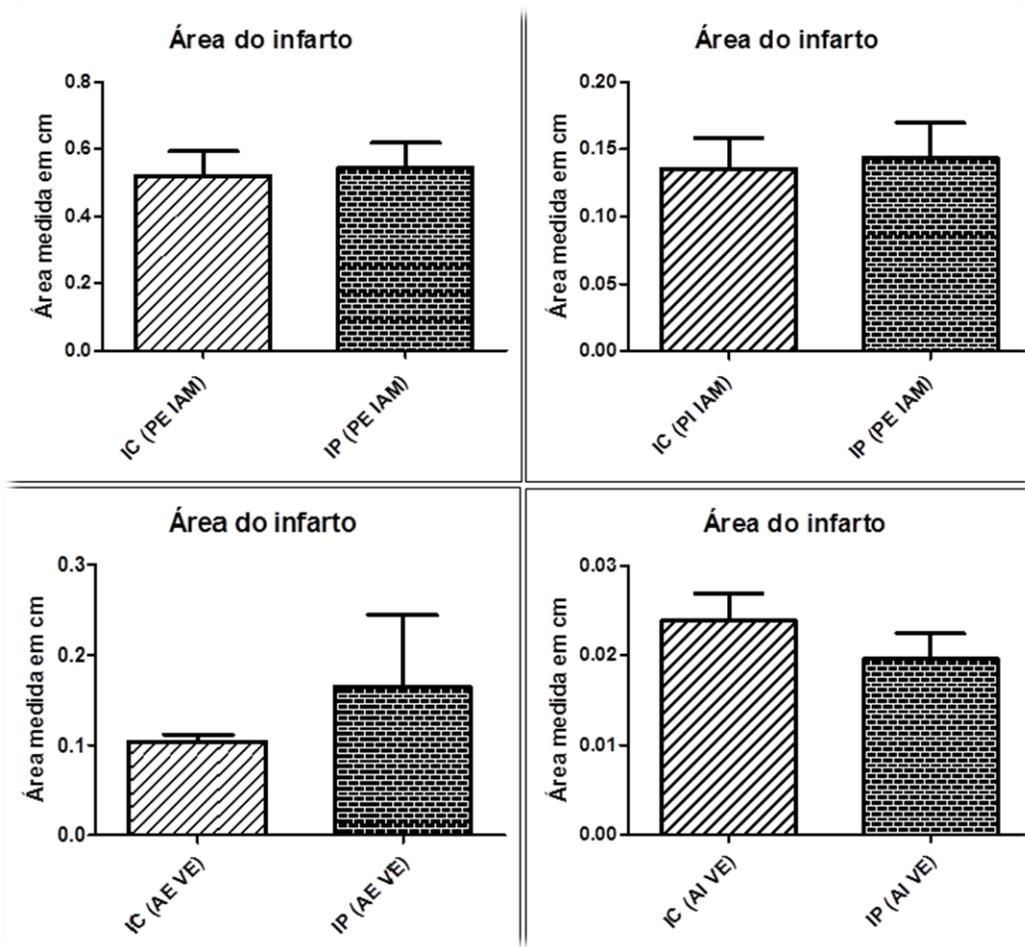


Figura 15: Mensuração do tamanho do infarto: PE IAM (perímetro externo do infarto), PI IAM (perímetro interno do infarto), AE VE (área externa do ventrículo esquerdo), AI VE (área interna do ventrículo esquerdo). Dados apresentados em média dos valores \pm erro padrão. ANOVA-one way post hoc bonferroni.

7.7 Análises quantitativa das fibras de colágeno

Conforme o esperado, o IAM (IC e IP) induziu o aumento do colágeno total cardíaco ao compararmos ao grupo CS (IC: 84 ± 7 , IP: 66 ± 9 vs CS: 24 ± 4). O grupo IP, apesar de apresentar uma leve redução, não foi estatisticamente significante em relação ao grupo IC.

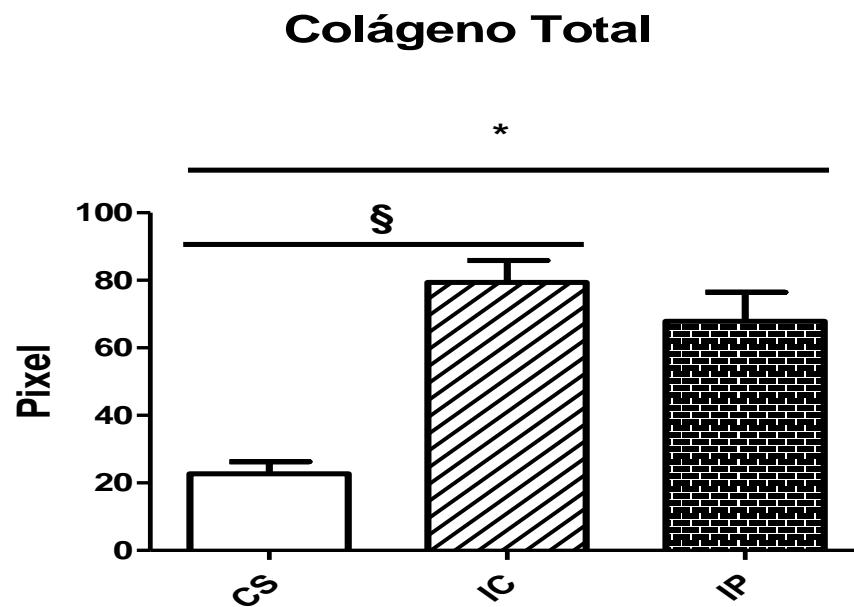


Figura 16. Quantificação de colágeno total no tecido cardíaco do rato SHR (CS, IC e IP). Dados apresentados em média dos valores \pm erro padrão. ANOVA-one way post hoc bonferroni. * $p<0,05$ IP vs CS. § $p<0,05$ IC vs CS.

8. DISCUSSÃO

Na busca da melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas adaptações morfológicas após IAM em animais hipertensos, objetivou-se no presente trabalho avaliar os efeitos da estimulação parassimpática, por meio da administração do antagonista farmacológico da acetilcolinesterase (brometo de piridostigmina), sobre o remodelamento ventricular e a polarização de macrófagos na fase subaguda do infarto do miocárdio em ratos SHR.

Vários grupos de pesquisas têm demonstrado interesse na busca de novos conhecimentos sobre a via anti-inflamatória colinérgica^{53,58,59,75,77}. Entre esses, podemos destacar o trabalho de Keven J. Tracer (2009), que enfatiza que o sistema nervoso através de um reflexo inflamatório do nervo vago, modulando a liberação de citocinas e, assim, prevenindo a lesão tecidual exacerbada. A via de sinalização neuronal eferente é denominada a via colinérgica anti-inflamatória⁷⁵.

De fato, alguns autores demonstraram papel da modulação vagal na redução da resposta inflamatória e na melhora do prognóstico em vários modelos experimentais de síndromes inflamatórias como: sepse⁷⁶, artrite reumatóide⁷⁷, miocardite viral^{78,79}, pancreatite⁸⁰, choque hemorrágico⁸¹, entre outras patologias. 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^{59,82,83}. Os resultados foram promissores e levaram ao início de estudos clínicos em paciente com quadro de insuficiência cardíaca congestiva. A base teórica para indicação dessa terapêutica encontra-se no conceito que o sistema

nervoso autônomo, mais especificamente o parassimpático, pode reduzir o processo inflamatório crônico que caracteriza os portadores de ICC⁸⁴.

Investigações experimentais do nosso grupo, já avaliou em ratos Wistar, normotensos, submetidos a IAM e tratados com PIR (40mg/kg/dia) 4 dias antes do IAM e após IAM por 3 dias, que a estimulação vagal através da PIR interfere na mobilização de linfócitos tanto a nível regional quanto sistêmico nessa fase precoce do IAM. No miocárdio, esta ação propiciou um aumento da concentração de linfócitos T CD4 e T CD8 na área infartada e reduziu a concentração de linfócitos T CD4 em áreas peri-infarto. Além disso, como efeito sistêmico a administração de PIR reduziu o número de linfócitos T convencionais CD4+ e CD8+ e aumentou o número de linfócitos T reguladores CD4+ e CD8+ no sangue. Essas respostas em conjunto favoreceram a modulação da resposta inflamatória. Concordando com a literatura, estes resultados sugerem que o aumento da atividade vagal induziu a uma melhor modulação da resposta inflamatória, repercutindo também na melhora dos parâmetros ecocardiográficos morfológicos e melhora do desempenho ventricular encontrados em trabalhos anteriores⁶¹.

Posteriormente ao trabalho realizado por Aparecida e cols.(2016), outro estudo realizado pelo nosso grupo com ratos Wistar normotensos, também submetidos ao IAM e tratados com PIR por 7 dias (dose 40mg/kg/dia) mostrou o efeito modulador em relação as células inflamatórias na área infartada, em especial, influenciando a relação de macrófagos M1/M2 e na redução das concentrações de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-6 e TNF-α), como também da citocina anti-inflamatório (IL-10) no VE de ratos após IAM. Somado

a isso também foi demonstrado o efeito farmacológico da PIR na modulação vagal, pela melhora em parâmetros da VFC no domínio da frequência³⁵.

Em nossos achados utilizando ratos da linhagem SHR, não foi possível observar resultados semelhantes em relação a modulação autonômica cardiovascular observados previamente em ratos normotensos. Várias hipóteses podem ser sugeridas, dentre elas, podemos citar a ausência de uma patologia de base nos diferentes modelos experimentais utilizados, o que exclui a hiperatividade simpática e, associado a isto, o curto período de tratamento parece ser ineficiente para alterar a modulação autonômica.

Em contrapartida, Lataro (2015), também utilizando ratos SHR machos e Ratos Wistar-Kyoto, tratados por 16 semanas com PIR (1,5 mg/kg/dia via s.c), evidenciou um aumento do tônus vagal cardíaco e redução do diâmetro dos cardiomiócitos e densidade de colágeno, mas não alterou os níveis de citocinas no coração e no plasma⁸⁵.

Em nossos achados, apesar de não observarmos alteração na modulação cardiovascular, a administração da PIR por 7 dias incrementou o número de macrófagos do tipo 2, melhorou a função sistólica e diminuiu os valores da PAS e PAD. Estes resultados foram semelhantes aos achados de Bezerra e cols (2016), evidenciando que ratos infartados e tratados com PIR aumentam a polarização de macrófagos M2, responsáveis diretos pelo remodelamento e reparo tecidual.

Estes resultados em conjunto, demonstram que a PIR é um potente inibidor da acetilcolinesterase, sendo efetiva no aumento da modulação vagal e inflamatória. É importante salientar que a proposta do nosso trabalho não era propor uma nova terapia anti-hipertensiva ou anti-inflamatória com drogas, mas

evidenciar a estimulação colinérgica como uma ferramenta para compreender os processos adaptativos envolvidos na hipertensão e suas comorbidades.

Fazendo uma revisão translacional, da bancada a clínica, Zarei et al (2011) investigou o efeito agudo da PIR em humanos adultos saudáveis, não fumantes, após dose única de PIR, seguido por exame sanguíneo e eletrocardiograma (ECG) em 11 momentos diferentes. Observaram concentração máxima da PIR em 150 minutos após administração, aumento da banda HF em 300 minutos, e aumento na VFC no domínio da frequência. Porém neste estudo após a administração de PIR não foi observado decréscimo na RMSSD⁸⁶.

Ainda nesse sentido, Behling et al (2003) investigaram a ação aguda da PIR (30mg) em humanos com insuficiência cardíaca (IC), medicados a cada 8 horas, monitorados após 24 horas da primeira dose, por 24 horas. Foram verificados redução da FC e aumento da VFC. Reduzindo de forma expressiva a arritmia ventricular nestes pacientes⁸⁷.

Importante salientar que em todos estes estudos citados anteriormente, pouco ou nenhum efeito colateral foi referido, demonstrando segurança na administração da PIR em humanos e seu potente efeito modulador vagal.

Em relação as análises da função ventricular por meio da ecoDopplercardiografia, notamos redução significativa da fração de ejeção nos grupos infartados, fato este já esperado devido ao IAM. Entretanto o grupo tratado com PIR, apresentou uma melhora da fração de encurtamento e do relaxamento ventricular.

Apesar da dificuldade de acharmos trabalhos com avaliações ecocardiográficas utilizando tratamento com PIR, alguns autores, como Lu *et al* (2014) relataram uma melhora da função cardíaca através da avaliação direta do ventrículo esquerdo. Esse autor utilizando ratos da linhagem Sprague-Dawley infartados e tratados com PIR por 14 semanas após 7 dias de IAM, com uma dose semelhante a utilizada em nosso estudo, foi observado uma melhora da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (LVEDP); redução da área infartada; redução do volume total de colágeno e tecido cardíaco mais complacente⁸⁸.

A disfunção ventricular e insuficiência cardíaca são complicações frequentes do IAM e estão associados a um mau prognóstico. É importante salientar que o conhecimento dos mecanismos relacionados e características clínicas são essenciais para o diagnóstico e tratamento da disfunção ventricular esquerda e insuficiência cardíaca após IAM⁸⁹⁻⁹².

Após o IAM, a necrose das células miocárdicas, dá início a uma cascata inflamatória que repara a área infartada de tecido morto de células e da matriz e promove o reparo do tecido, com a formação de uma cicatriz. Esse reparo cardíaco leva a alterações na arquitetura do ventrículo, denominadas em conjunto como “remodelamento ventricular”. Alterações celulares e moleculares associadas ao remodelamento ventricular afetam a área necrótica e também segmentos não infartados dos ventrículos. E como manifestação clínica, além de alteração da geometria do ventrículo, pode ocorrer comprometimento da função e desenvolvimento de IC. A extensão do remodelamento depende da área infartada como também é afetada pelas alterações estruturais decorrentes da

cicatrização. Diante disso, a resposta inflamatória que segue à injúria isquêmica é de fundamental importância⁹³.

Os macrófagos são importantes células na resposta do sistema imunológico, estes são amplamente reconhecidos por dois tipos principais de macrófagos, este é de acordo com a sua expressão fenotípica, que são: o macrófago M1, pró-inflamatório e o macrófago M2, anti-inflamatório²⁰.

Na inflamação desencadeada após IAM podemos observar, um crescente aumento populacional de macrófagos M1 no tecido lesado, com pico no 1-3 dia, semelhante a população de neutrófilos, com grande decréscimo já no quinto dia^{94,95}. A população de macrófagos M1 representa cerca de 70% da população de macrófagos envolvida⁹⁶, e expressam grande quantidade de mediadores inflamatórios⁹⁷.

A resposta tardia se inicia gradualmente no quinto dia, com aumento gradual dos macrófagos M2, marcando assim a fase reparativa⁹⁸. A população de macrófagos M2 representa cerca de 20% da população de macrófagos envolvida⁹⁹, e expressam grande quantidade de mediadores anti-inflamatórios^{100,101}. O pico populacional de células dendríticas, células B, *Natural Killer* (NK), *Natural Killer T* (NKT) e células T reg acontece em torno do sétimo dia¹⁰².

Os macrófagos apresentam uma sobrevida de apenas algumas horas no tecido. Contudo sua redução na área inflamada parece ser estável, devido à elevada taxa de deslocamento de novas células do baço, da medula óssea e proliferação local. Diferentemente do estado não ativado, em que o macrófago pode sobreviver meses no tecido. Cada vez mais, acredita-se que a transição de

polarização de macrófagos do M1 clássica direção em menor fenótipo inflamatório M2 é um evento chave na reparação do IAM^{103,104}.

A presença de células do sistema imune são essenciais para o processo de cicatrização após IAM. Portanto o desajuste deste processo, como o aumento da presença destas células em região peri-infarto pode levar a uma resposta “autoimune” patológica com aumento de danos e piora no remodelamento ventricular¹⁰⁵.

Em nosso estudo foi demonstrado uma maior polarização de macrofagos totais no grupo infartado com tratamento (IP) e também maior polarização de macrófagos do tipo M2, seguidos dos ratos apenas infartados (IC), mostrando que o infarto aumenta a quantidade de macrófago M2, os quais são responsáveis diretos pelo remodelamento e reparo tecidual.

Inúmeras evidências têm demonstrado que a resposta autoimune exerce uma importante função no processo de remodelamento ventricular, grandes expectativas têm se criado em torno da supressão ou regulação deste processo inflamatório. Alguns ensaios clínicos usando metilprednisolona em pacientes pós IAM, mostrou resultados catastróficos, com redução da infiltração de leucócitos, atraso do processo de deposição de colágeno e cicatrização, aumento da incidência de arritmias ventriculares e aumento da área de infarto^{106,107}. Várias drogas anti-citocinas quando usadas em larga escala tem mostrado resultados desapontadores¹⁰⁸.

No entanto, drogas cardiovasculares, como as estatinas, IECA e bloqueadores do canal de cálcio, tem mostrado redução da produção de citocinas e melhora da função e o remodelamento do VE após IAM, mas o mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido, mas parcialmente

dependente de modulação inflamatória¹⁰⁹. A simvastatina atenua a produção de citocinas inflamatórias nas áreas infartada e não infartada, reduzindo o depósito de colágeno e melhora da função ventricular. A atorvastatina pode suprimir a resposta TH1 mas sem afetar a resposta TH2 em pacientes com IAM, o que pode ser o mecanismo pelo qual ela previne a insuficiência cardíaca pós IAM¹¹⁰.

Portanto a efeito benéfico da ativação da via anti-infamatória colinérgica em um modelo genético de hipertensão espontânea (SHR) associado a uma das suas comorbidades como IAM, nos abre horizontes para futuras estratégias terapêuticas sobre a resposta neuroimunomoduladora.

9. CONCLUSÕES

Em conclusão a estimulação colinérgica com PIR (40mg/kg/dia) por 7 dias em ratos SHR associado ao IAM evidencia uma abordagem farmacológica envolvendo a inibição da acetilcolinesterase induzindo efeitos benéficos sobre o perfil hemodinâmico, função cardíaca e modulação inflamatória subaguda após o IAM em ratos espontaneamente hipertensos, não repercutindo na modulação autonômica.

Entretanto atenuou a disfunção ventricular promovida pelo IAM, provavelmente, devido ao processo inflamatório e polarização de macrófagos do tipo M2. Estes resultados nos fornece evidências de uma abordagem farmacológica envolvendo a inibição da acetilcolinesterase induzindo efeitos benéficos sobre a modulação inflamatória aguda após o IAM.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization, Health statistics and informatics Department. Causes of death 2008 summary tables.
<http://apps.who.int/ghodata/vid=10015, 2001.>
2. World Health Organization, Health statistics and informatics Department. Cardiovascular diseases (CVDs). Fact sheet N°317. Updated January 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets>.
3. Lima e Costa MFF, Guerra HL, Barreto SM, Guimarães RM. Diagnóstico da situação de saúde da população idosa brasileira: um estudo da mortalidade e das internações hospitalares públicas. Informe Epidemiológico do SUS 2000.
4. Veterans Administration Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents. Effects of treatment on morbidity in hypertension: results in patients with diastolic blood pressure averaging 115 through 129 mmHg. JAMA 1997.
5. Irigoyen, et al. Hypertension, Blood Pressure Variability, and Target Organ Lesion. Curr Hypertens Rep 2016.
6. Wilson Pwf et al. Twelve-year incidence of coronary heart disease in middle-aged adults during the era of hypertensive therapy: The Framingham Offspring Study. Am J Med 90: 11-16, 1991.
7. Nobre, F.; Ribeiro, A. B.; Mion, D., JR. [Control of arterial pressure in patients undergoing anti-hypertensive treatment in Brazil: Controlar Brazil]. Arq Bras Cardiol, v. 94, n. 5, p. 663-70, May 2010.

8. Irigoyen, M. C. et al. The relationship between renal sympathetic nerve activity and arterial pressure after selective denervation of baroreceptors and chemoreceptors. *Braz J Med Biol Res*, v. 24, n. 2, p. 219-22, 1991.
9. Paul A, Heidenreich PA, Trogdon 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.
10. 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 2001; Geneva: World Economic Forum.
11. Tsujita K, Kaikita K, Soejima H, Sugiyama S, Ogawa H. [Acute coronary syndrome-initiating factors]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine* 2010.
12. Tennant R, Wiggers CJ. The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *American Journal of Physiology* 1935.
13. Pfeffer MA. Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Annu. Rev. Med.* 1995.
14. Schenke-Layland K, Stock UA, Nsair A, Xie J, Angelis E, Fonseca CG, Larbig R, Mahajan A, Shivkumar K, Fishbein CM, MacLellan WR. Cardiomyopathy is associated with structural remodeling of heart valve extracellular matrix. *European Heart Journal*; 2009.

15. Wong SP, French JK, Lydon AM, Manda SO, Gao W, Ashton NG, et al. Relation of left ventricular sphericityto 10-year survival after acute myocardial infarction. Am J Cardiol. 2004.
16. Nathan C. Points of control in inflammation. Nature 2002.
17. Bolli R. Oxygen - derived free radicals and post ischemic myocardial dysfunction ('stunned myocardium'). J Am Coll Cardiol 1988.
18. Picard MH, Wilkins GT, Gillam LD, et al. Immediate regional endocardial surface expansion following coronary occlusion in the canine left ventricle: disproportionate effects of anterior versus inferior ischemia. Am. Heart J. 1991.
19. Elomaa, O.; Sankala, M.; Pikkarainen, T., et al. Structure of the Human Macrophage MARCO Receptor and Characterization of Its Bacteria-binding Region. The journal of biological chemistry. 1998.
20. De La Torre, E.; Genaro, A. M.; Ribeiro, M. L., et al. Proliferative actions of muscarinic receptors expressed in macrophagesderived from normal and tumor bearing mice. Biochimica et Biophysica, 2008.
21. Appelberg, R. As células Fagocíticas.In C. Avevedo. Biologia Celular e molecular. Lisboa, 2005.
22. Takeda, K. e Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. International Immunology, 17, 2005.
23. Pacheco, F. C. e Cardoso, E. M. Imunidade inata e inflamação.In F. A. Arosa; Cardoso, E. M. e Pacheco, F. C. Fundamentos de imunologia. Lisboa, 2012.
24. Akpek M, Kaya MG, Lam YY, Sahin O, Elcik D, Celik T, Ergin A, Gibson CM. Relation of neutrophil/lymphocyte ratio to coronary flow to in-hospital

- major adverse cardiac events in patients with ST-elevated myocardial infarction undergoing primary coronary intervention. Am J Cardiol. 2012.
25. Nuñez J, Nuñez E, Bodi V. Usefulness of the neutrophil to lymphocyte ratio in predicting long-term mortality in ST segment elevation myocardial infarction. Am J Cardiol. 2008.
26. Sanchis J, Bodi V, Nuñez J. Prognostic usefulness of white-blood cell count on admission and one-year outcome in patients with non-ST elevation acute chest pain. Am J Cardiol. 2006.
27. Horne BD. Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk. J Am Coll Cardiol. 2005.
28. Dragu R, Zuckerman R, Suleiman M. Predictive value of White blood cell subtypes for long-term outcome following myocardial infarction. Atherosclerosis. 2008.
29. Nahrendorf M, Swirski FK. Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. Circ Res 2013.
30. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. Circ Res 2012.
31. Heidt T, Courties G, Dutta P, Sager H, Sebas M, Iwamoto Y, et al. Differential Contribution of Monocytes to Heart Macrophages in Steady-State and After Myocardial Infarction. Circulation research 2014.
32. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. Physiol Rev 1997.
33. Ruoss SJ, Hartmann T, Caughey GH. Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. J Clin Invest 1991.
34. Valen G, Yan ZQ, Hansson GK. Nuclear factor kappa-B and the heart. J Am Coll Cardiol. 2001.(Review)

35. Bezerra O, França C, et al. Cholinergic stimulation improves redox state and decreases inflammatory cytokine production after Myocardial Infarction in rats. *Clinical Science*. Submissão 30/06/2016.
36. Blalock JE. The immune system as the sixth sense. *J Intern Med*. 2005.
37. Schaper W. Angiogenesis in the adult heart. *Basic Res Cardiol* 1991.
38. Czubryt MP. Common threads in cardiac fibrosis, infarct scar formation, and wound healing. *Fibrogenesis & tissue repair* 2012.
39. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000.
40. Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic anti-inflammatory pathway. *J Clin Invest* 2007.
41. Pfeffer MA. Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Annu. Rev. Med.* 1995.
42. Schenke-Layland K, Stock UA, Nsair A, Xie J, Angelis E, Fonseca CG, Larbig R, Mahajan A, Shivkumar K, Fishbein CM, MacLellan WR. Cardiomyopathy is associated with structural remodeling of heart valve extracellular matrix. *European Heart Journal*; 2009.
43. Erlebacher JA, Weiss JL, Weisfeldt ML, Bulkley BH. Early dilation of the infarcted segment in acute transmural myocardial infarction: role of infarct expansion in acute left ventricular enlargement. *J. Am. Coll. Cardiol*; 1984.
44. Eaton LW, Weiss JL, Bulkley BH, et al. Regional cardiac dilatation after acute myocardial infarction. Recognition by two-dimensional echocardiography. *New Engl. J. Med.* 1979.

45. Gaudron P, Eilles C, Kugler I, Ertl G. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction: potential mechanisms and early predictors. *Circulation*. 1993.
46. Melguizo C, Prados J, Velez C, Aranega AE, Marchal JA, Aranega A. Clinical significance of antiheart antibodies after myocardial infarction. *Jpn Heart J* 1997.
47. Picard MH, Wilkins GT, Gillam LD, et al. Immediate regional endocardial surface expansion following coronary occlusion in the canine left ventricle: disproportionate effects of anterior versus inferior ischemia. *Am. Heart J.* 1991.
48. Capasso jm, li p, zhang x, anversa p. Heterogeneity of ventricular remodeling after acute myocardial infarction in rats. *Am j physiol* 1992.
49. Gaballa MA, Goldman S. Ventricular remodeling in heart failure. *J Card Fail*. 2002.
50. Anand IS. Ventricular remodeling without cellular contractile dysfunction. *J Card Fail* 2002.
51. Mann D. Basic mechanisms of left ventricular remodeling: the contribution of wall stress. *J card Fail* 2002.
52. Breyer-Pfaff U, Schumm F. Pyridostigmine kinetics in healthy subjects and patients with myasthenia gravis. *Clin Pharmacol Ther*. 1985.
53. Nóbrega AC, dos Reis AF, Moraes RS, Bastos BG, Ferlin EL, Ribeiro JP. Enhancement of heart rate variability by cholinergic stimulation with pyridostigmine in healthy subjects. *Clin Auton Res*. 2001.
54. Sueta CA. Heart rate variability in chronic heart failure: target for therapy. *Am Heart J*. 2003.

55. Castro RRT, Porfirio G, Serra SM, Nóbrega ACL. Cholinergic stimulation with pyridostigmine reduces the QTc interval in coronary artery disease. *Braz J Med Biol Res* 2002.
56. Sant'anna ID, Nóbrega AC. Cardiac function during mental stress: cholinergic modulation with pyridostigmine in healthy subjects. *Clin Sci* 2003.
57. Raj SR, Black BK, Biaggioni I, Harris PA, Robertson D. Acetylcholinesterase inhibition improves tachycardia in postural tachycardia syndrome. *Circulation* 2005.
58. 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.
59. De La Fuente RN, Irigoyen MC ET AL. Enhancement of vagal-mediated heart rate responsiveness by cholinergic stimulation in rats. *Journal of Hypertension* 2004.
60. Seals, D. R. et al. Exercise and aging: autonomic control of the circulation. *Med Sci Sports Exerc*, v. 26, n. 5, p. 568-76, May 1994.
61. Aparecida JR, et al. Increase in cholinergic modulation with pyridostigmine induces anti-inflammatory cell recruitment soon after acute myocardial infarction in rats. *American Journal of Physiology*. 2016.
62. Sharma, A. et al. Involvement of catecholamines and serotonin in human hypertension. *Pharmacol Res Commun*, v. 17, n. 6, p. 565-74, Jun 1985.
63. Trippodo, N. C.; Frohlich, E. D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. *Man and rat. Circ Res*, v. 48, n. 3, p. 309-19, Mar 1981.

64. Frohlich, E. D.; Pfeffer, M. A. Adrenergic mechanisms in human hypertension and in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci Mol Med Suppl*, v. 2, p. 225s-238s, Jun 1975.
65. Okamoto, K. et al. Further observations of the development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*, v. 30, n. 6, p. 703-16, Jun 1966.
66. Elser D, Riegger GAJ. Characteristics and clinical relevance of animal models of heart failure. *Cur Opin Cardiol*. 1995.
67. Blankesteijn WM, Creemers E, Lutgens E, Cleutiens JP, Daemen MJ, Smits JF. Dynamic of cardiac wound healing following myocardial infarction: observations in genetically altered mice. *Acta Physiol Scand*. 2001.
68. Pagani, M. et al. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ Res*, v. 59, n. 2, p. 178-93, Aug 1986.
69. Schiller NB, Acquatella H, Ports TA, Drew D, Goerke J, Ringertz H, Silverman NH, Brundage B, Botvinick EH, Boswell R, Carlsson E, Parmley WW. Left ventricular volume from paired biplane two dimensional echocardiography. *Circulation*. 1979.
70. Fard A, Wang CY, Takuma S, Skopicki HA, Pinsky DJ, Di Tullio MR, Hommas. Noninvasive assessment and necropsy validation of changes in left ventricular mass in ascending aortic banded mice. *J Am. Soc. Echocardiogr*. 2000.
71. Broberg, C. S., Pantely, G. A., Barber, B. J., Mack, G. K., Lee, K., Thigpen, T., Davis, L. E., Sahn, D. and Hohimer, A. R. (2003). Validation of the

- myocardial performance index by echocardiography in mice: a noninvasive measure of left ventricular function. J. Am. Soc. Echocardiog. 16,814 -823.2003.
72. Koike, MK; Frimm CC; Cúri, M. Low coronary driving pressure early in the course of myocardial infarction is associated with subendocardial remodelling and left ventricular dysfunction. Int J Exp Pathol; 88(4):279-90, 2007.
73. Junqueira LC, Montes GS, Sanchez EM (1982) The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picosirius-polarization method. Histochemistry 74:153-6.1992.
74. Hadi AM, Mouchaers KT, Schalij I, Grunberg K, Meijer GA, Vonk-Noordegraaf A et al (2011) Rapid quantification of myocardial fibrosis: a new macro-based automated analysis. Cell Oncol (Dordr). 2011.
75. Tracey KJ. Reflex control of immunity. Nat Rev Immunol. 2009.
76. Wang H, Liao H, Ochani M. Cholinergic agonist inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. Nat Med. 2004.
77. Koopman FA, Schuurman PR, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Vagus nerve stimulation: A new bioelectronics approach to treat rheumatoid arthritis? Best Practice & Research Clinical Rheumatology 2014.
78. Levine YA, Koopman FA, Faltys M, Caravaca A, Bendele A, Zitnik R, Vervoordeldonk MJ, TakPP. Neurostimulation of the cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates disease in rat collagen-induced arthritis. PLoS One 2014.

79. 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.
80. 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. Critical Care Med. 2011.
81. 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 Journal Gastroenterol. 2013.
82. Lujan HL, Janbajah H, Feng H-Z, Jin J-P, DiCarlo SE. Myocardial ischemia, reperfusion, and infarction in chronically instrumented, intact, conscious, and unrestrained mice. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 2012.
83. Zhang R, Wugeti N, Sun J, et al. Effects of vagus nerve stimulation via cholinergic anti-inflammatory pathway activation on myocardial ischemia/reperfusion injury in canine. International Journal of Clinical and Experimental Medicine 2014.
84. Leib C, Katus HA, Kaya Z. Cholinergic control of inflammatory in cardiovascular diseases. Trends in cardiovascular medicine 2013.
85. Lataro, et, al. Acetylcholinesterase Inhibition Attenuates the Development of Hypertension and Inflammation in Spontaneously Hypertensive Rats. American Journal of Hypertension. 2015.

86. Zarei AA, Foroutan SA, Foroutan SM, Erfanian Omidvar A. Enhancement of Frequency Domain Indices of Heart Rate Variability by Cholinergic Stimulation with Pyridostigmine Bromide. Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR 2011.
87. Behling A, Moraes RS, Rohde LE, Ferlin EL, Nobrega AC, Ribeiro JP. Cholinergic stimulation with pyridostigmine reduces ventricular arrhythmia and enhances heart rate variability in heart failure. Am. Heart J. 2003.
88. 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- β 1/TGF- β 1 – activated kinase pathway. J Cardiovasc Pharmacol 2014.
89. Cleland JGF, Torabi A, Khan NK: Epidemiology and management of heart failure and left ventricular systolic dysfunction in the aftermath of a myocardial infarction. Heart, 2005.
90. Minicucci MF, Azevedo PS, Polegato BF et al: Heart failure after myocardial infarction: clinical implications and treatment. Clin Cardiol, 2011.
91. Gheorghiade M, Fonarow GC: Management of post-myocardial infarction patients with left ventricular systolic dysfunction. Am J Med, 2007.
92. Azevedo, et al. Early echocardiographic predictors of increased left ventricular end-diastolic pressure three months after myocardial infarction in rats. Med Sci Monit, 2012.
93. Anzai T. Post-infarction inflammation and left ventricular remodeling. Review. Circ J. 2013.

94. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001.
95. Yan X, Anzai A, Katsumata Y, Matsuhashi 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.
96. Vandervelde S, van Amerongen MJ, Tio RA, Petersen AH, van Luyn MJ, Harmsen MC (2006) Increased inflammatory response and neovascularization in reperfused vs. non-reperfused murine myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol* 2006.
97. Ismahil MA, Hamid T, Bansal SS, Patel B, Kingery JR, Prabhu SD. Remodeling of the mononuclear phagocyte network underlies chronic inflammation and disease progression in heart failure: critical importance of the cardiosplenic axis. *Circ Res* 2014.
98. Hayashi Y, Sawa Y, Otake S, Fukuyama N, Nakazawa H, Matsuda H. Peroxynitrite formation from human myocardium after ischemia-reperfusion during open heart operation. *Ann Thorac Surg* 2001.
99. Halade GV, Jin YF, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase (MMP)-9: a proximal biomarker for cardiac remodeling and a distal biomarker for inflammation. *Pharmacol Ther* 2013.
100. Troidl C, Mollmann H, Nef H, Masseli F, Voss S, Szardien S, et al. Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction. *Journal of cellular and molecular medicine* 2009.

101. Ismahil MA, Hamid T, Bansal SS, Patel B, Kingery JR, Prabhu SD. Remodeling of the mononuclear phagocyte network underlies chronic inflammation and disease progression in heart failure: critical importance of the cardiosplenic axis. *Circ Res* 2014.
102. Halade GV, Jin YF, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase (MMP)-9: a proximal biomarker for cardiac remodeling and a distal biomarker for inflammation. *Pharmacol Ther* 2013.
103. 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. *The Journal of experimental medicine* 2012.
104. Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2005.
105. Liao YH, Cheng X. Autoimmunity in myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2006.
106. Roberts R, DeMello V, Sobel BE. deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. *Circulation*. 1976.
107. Kloner RA, Fishbein MC, Lew H, Maroko PR, Braunwald E. Mummification of the infarcted myocardium by high dose corticosteroids. *Circulation*. 1978.
108. Chung ES, Packer M, Lo KH. Randomized, double-blind, placebocontrolled, 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.
109. Mann DL, McMurray JJ, Packer M. Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL). Circulation. 2004.
110. Zhang J, Chen X, Liao YH. Simvastatin regulates myocardial cytokine expression and improves ventricular remodeling in rats after acute myocardial infarction. Cardiova