

**RODRIGO SCHMIDT**

**Efeitos da estimulação elétrica do nervo depressor aórtico na modulação da  
resposta inflamatória pós infarto agudo do miocárdio em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título de  
Doutor em Ciências.

Programa de Cardiologia  
Orientador: Profa. Dra. Maria Claudia Costa Irigoyen

**São Paulo**

**2018**

**RODRIGO SCHMIDT**

**Efeitos da estimulação elétrica do nervo depressor aórtico na modulação da resposta inflamatória pós infarto agudo do miocárdio em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de Cardiologia

Orientador: Profa. Dra. Maria Cláudia Costa Irigoyen

**São Paulo**

**2018**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Schmidt, Rodrigo  
Efeitos da estimulação elétrica do nervo  
depressor aórtico na modulação da resposta  
inflamatória pós infarto agudo do miocárdio em ratos  
/ Rodrigo Schmidt. -- São Paulo, 2018.  
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Cardiologia.  
Orientadora: Maria Claudia Costa Irigoyen.  
Coorientador: Paulo Magno Martins Dourado.

Descritores: 1. Infarto do miocárdio 2. Inflamação  
3. Barorreflexo 4. Estimulação elétrica 5. Ratos  
6. Ecocardiografia

USP/FM/DBD-461/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## **DEDICATÓRIA**

---

Àquele que é capaz de fazer infinitamente mais do que tudo o que pedimos ou pensamos, de acordo com o seu poder que atua em nós, a ele seja a glória na igreja e em Cristo Jesus, por todas as gerações, para todo o sempre! Amém! Efésios 3:20,21

Aos meus pais Sigmar e Jurema pelo amor e suporte incondicionais.

À minha esposa Kelen pela parceria e dedicação de sua vida para construirmos  
JUNTOS todas as coisas com ALEGRIA!

Aos meus filhos Nicolás e Rebeca, presentes amados de Deus que nos permitem viver  
intensamente todos os momentos

Aos meus sogros Mario e Irena por sempre me receberem como um filho.

Aos meus irmãos (Raquel e Lucas), meus cunhados (Carlos, Soraya, Daiane, Jamile e Pablo), e meus sobrinhos (Ana, Daniel, Pedro e Davi)

## **AGRADECIMENTOS**

---

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Claudia Costa Irigoyen. Obrigado por essa oportunidade de crescimento e amadurecimento acadêmico e científico. Por me receber sem me conhecer, por confiar e dedicar seu precioso tempo em todas as etapas desse desafio. Obrigado por ter aberto as portas do mundo com sua rede de relacionamentos, possibilitando-me viver experiências riquíssimas. Obrigado por seu dinamismo e coerência científica.

À Dra. Mariana Morris que se tornou muito mais que minha mentora internacional. Uma amiga muito especial que hoje considero minha família. Obrigado por todo o apoio e por viabilizar a conclusão desse trabalho.

À Dra. Jacqueline Freire Machi pelos 3 anos de parceria no trabalho. Que seja apenas o começo...

À uma pessoa muito especial com a qual aprendi muito. Meu sempre Mestre e amigo, Seu Edson Moreira! Obrigado por sua persistência e capricho, que viabilizaram a execução desse estudo. Obrigado pelos melhores momentos dessa pesquisa...

Aos parceiros de “mão na massa” – Leandro e Maikon. Obrigado por contribuírem com sua precisão e destreza cirúrgica. Leonardo e Bruno: “The ECO guys”, obrigado.

Obrigado Sílvia, Isabel, Oscar, Kátia, Paula, Alexandre, Ivana, Amanda, Nathalia e demais colegas de Lab.

Obrigado, Profa. Dra. Elia, Dra. Nilsa e mais uma vez Dra. Amanda.

Obrigado Dr. Cristiano Teixeira Mostarda, Dr. Humberto Delle, Dra. Fernanda Consolim-Colombo, Dra. Kátia De Angelis e seus super alunos!

Obrigado Dra. Edna e todos do biotério Incor.

Obrigado Dra. Klimas e Ana Del Alamo.

Obrigado minha amada esposa Kelen e aos meus filhos Nicolás e Rebeca por todo suporte em amor

“Quanto ao mais, irmãos, tudo o que é verdadeiro,  
tudo o que é honesto, tudo o que é justo,  
tudo o que é puro, tudo o que é amável,  
tudo o que é de boa fama, se há alguma virtude,  
e se há algum louvor, nisso pensai.

Filipenses 4:8”

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:  
Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3<sup>a</sup>. Ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## **SUMÁRIO**

---

	<b>LISTA DE SÍMBOLOS .....</b>	<b>14</b>
	<b>LISTA DE SIGLAS .....</b>	<b>15</b>
	<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>18</b>
	<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>21</b>
	<b>RESUMO .....</b>	<b>22</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>25</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>33</b>
<b>2.1</b>	<b>Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) e Remodelação Cardíaca (RC)</b>	<b>34</b>
<b>2.2</b>	<b>Cascata do Complemento .....</b>	<b>37</b>
<b>2.3</b>	<b>Espécies Reativas de Oxigênio .....</b>	<b>38</b>
<b>2.4</b>	<b>Amplificação de citocinas e quimiocinas .....</b>	<b>38</b>
<b>2.5</b>	<b>Resposta inflamatória celular no infarto – Neutrófilos e Monócitos .....</b>	<b>39</b>
<b>2.6</b>	<b>Via anti-inflamatória colinérgica .....</b>	<b>40</b>
<b>2.7</b>	<b>O barorreflexo .....</b>	<b>42</b>
<b>2.8</b>	<b>Estimulação do Nervo Depressor Aórtico .....</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>45</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais e grupos experimentais .....</b>	<b>47</b>
<b>4.2</b>	<b>Sequência Experimental .....</b>	<b>47</b>
<b>4.3</b>	<b>Canulação da Artéria e Veia Femoral .....</b>	<b>48</b>
<b>4.4</b>	<b>Modelo Experimental de IAM .....</b>	<b>49</b>
<b>4.5</b>	<b>Implantação do eletrodo e estimulação elétrica do Nervo Depressor Aórtico .....</b>	<b>50</b>
<b>4.6</b>	<b>Valores hemodinâmicos, Variabilidade da Pressão Arterial e Variabilidade dos Intervalos de Pulso .....</b>	<b>52</b>
<b>4.7</b>	<b>Avaliação do Reflexo Pressorreceptor .....</b>	<b>53</b>
<b>4.8</b>	<b>Avaliação da área infartada e da função cardíaca por meio da ecocardiografia .....</b>	<b>55</b>

<b>4.9</b>	<b>Amostragem para obtenção de cortes histológicos .....</b>	<b>56</b>
<b>4.10</b>	<b>Coloração pela Hematoxilina-eosina e identificação histopatológica .....</b>	<b>57</b>
<b>4.11</b>	<b>Coloração pelo picrossírius-hematoxilina e identificação das fibras colagênicas .....</b>	<b>58</b>
<b>4.12</b>	<b>Análise quantitativa das fibras colagênicas Análise qualitativa das fibras colagênicas .....</b>	<b>58</b>
<b>4.13</b>	<b>Análise qualitativa das fibras colagênicas .....</b>	<b>59</b>
<b>4.14</b>	<b>Avaliação de macrófagos M1 (CD68+) e M2 (CD206+) em área peri-lesão de infarto por meio da técnica de imuno-histoquímica</b>	<b>60</b>
<b>4.15</b>	<b>Marcadores sistêmicos de estresse oxidativo .....</b>	<b>61</b>
<b>4.16</b>	<b>Coleta de tecidos e eutanásia do animal .....</b>	<b>63</b>
<b>4.17</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>64</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
<b>5.1</b>	<b>Parte I - Resultados referentes ao protocolo experimental .....</b>	<b>66</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Estimulação elétrica do NDA no rato acordado .....</b>	<b>66</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Valores hemodinâmicos, variabilidade do intervalo de pulso e variabilidade da pressão arterial .....</b>	<b>68</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Parâmetros ecocardiográficos .....</b>	<b>71</b>
<b>5.1.4</b>	<b>Avaliação histopatológica da lesão .....</b>	<b>74</b>
<b>5.1.5</b>	<b>Avaliação da proporção de Macrófagos M1(CD68+) e macrófagos M2(CD206+) na região peri-lesão do IAM por imuno-histoquímica .....</b>	<b>79</b>
<b>5.1.6</b>	<b>Marcadores sistêmicos de estresse oxidativo .....</b>	<b>81</b>
<b>5.2</b>	<b>Parte II – Revisão Sistemática .....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>112</b>
	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>124</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>126</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>145</b>

**LISTAS**

---

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
µm	Micrômetro
A	Ampere
cm	Centímetro
Hz	Hertz
kg	Quilograma
l/min	Litros por minuto
mA	Miliampere
mg/kg	Miligrama por quilograma
MHz	Megahertz
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetros de Mercúrio
mmol/l	Milimol/litro
ms	Milissegundos
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
U	Unidades

## LISTA DE SIGLAS

A	Contração atrial
Ach	Acetilcolina
AchR	Receptor de Acetilcolina
ANOVA	Análise de Variância
BPM	Batimentos por Minuto
C3	Componente 3 do Sistema Complemento
C5	Componente 5 do Sistema Complemento
CD	CompactDisc
CD4+	Linfócito T Auxiliar
CD8+	Linfócito T citotóxicoou Linfócito T Killer
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAS	Deservação Sino Aórtica
DNPH	Dinitro fenil hidrazina
E	Velocidade diastólica precoce
E/A	Relação entre velocidade diastólica precoce e a contração atrial
ECO	EcoDopplercardiografia
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme-LinkedImmunsorbentAssay ou Ensaio de ImunoabsorçãoEnzimática
F	Frequência
FACS	Separação de célula pela atividade de fluorescência
FC	Frequência Cardíaca
Foxp3-	Subtipos Convencionais
Foxp3+	Subtipos Reguladores
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GMP	Guanosina Monofosfato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio

HF	Alta Frequência
HRP	Peroxidase Rabanete
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IAM+EST	Infarto Agudo do Miocárdio + Estimulação Elétrica
IBR	Índice de Bradicardia Reflexa
IC	Insuficiência Cardíaca
ICAM-1	Molécula de Adesão Endotelial Intercelular
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IL-10	Interleucina 10
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6
ITR	Índice de Taquicardia Reflexa
LF	Baixa Frequência
M1 e M2	Macrófago tipo 1 e 2
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócito 1
MCP-1/CCL2	Proteína Quimiotática de Monócitos
MPP	Metaloproteinases da Matriz Extracelular
NaOH	Hidróxido de Sódio
NDA	Nervo Depressor Aórtico
OV%	Modulação Simpática
PA	Pressão Arterial
PAM	Pressão Arterial Média
PBS	Tampão fosfato-salino
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
P-selectina	Proteína Selectina
PV	Polivinil
RMSSD	Desvio Padrão das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes
RPM	Rotações por Minuto
SBCAL	Sociedade Brasileira da Ciência de Animais de Laboratório
sCR1	Receptor de Complemento Humano Tipo 1
SDNN	Desvio padrão da média de todos os intervalos RR normais

SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
SP	São Paulo
T	Tempo
TBARS	Substância reativa ao ácido tiobarbitúrico
TBS	Éter terc-butildimetilsilil
TCA	Ácido Tricloroacético
TGF- $\beta$	Fator de Transformação de Crescimento Beta
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TPTZ	Tripodil-s-triazina
TRIV	Tempo de Relaxamento Isovolumétrico
USP	Universidade de São Paulo
VFC	Variabilidade da Frequência Cardíaca
VIP	Variabilidade de Intervalo de Pulso
VLF	Muito Baixa Frequência
VPA	Variabilidade da Pressão Arterial
VUR	Verticais Uniformes Randômicos

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Fases do reparo no Infarto Agudo do Miocárdio experimental de ratos .....	32
<b>Figura 2</b>	Patogênese da Insuficiência Cardíaca .....	36
<b>Figura 3</b>	Reflexo Inflamatório .....	41
<b>Figura 4</b>	Sequência Experimental .....	49
<b>Figura 5</b>	Região de dissecação para a cateterização da artéria e veia femoral (A) e isolamento da artéria femoral e inserção do cateter (B) .....	50
<b>Figura 6</b>	Cirurgia de ligadura da artéria coronária para indução do IAM .	51
<b>Figura 7</b>	Aspecto macroscópico de duas fatias consecutivas obtidas de um mesmo coração, por secção transversal, mostrando a região do infarto (setas) na parede ventricular .....	51
<b>Figura 8</b>	Implantação do eletrodo bipolar de platina .....	52
<b>Figura 9</b>	Sessão de estimulação do NDA com registro da pressão arterial no rato acordado .....	53
<b>Figura 10</b>	Registro da PA e da FC antes e após a administração de drogas vasoativas .....	55
<b>Figura 11</b>	Ilustrações do procedimento para obtenção das fatias de coração, segundo o método de cortes verticais uniformes randômicos (VUR) .....	58
<b>Figura 12</b>	Micrografia para quantificação das fibras de colágeno .....	60
<b>Figura 13</b>	Comportamento da Pressão Arterial Média nos três dias de estimulação .....	68
<b>Figura 14</b>	Registro da PA no início de uma sessão de estimulação no terceiro dia pós IAM .....	68
<b>Figura 15</b>	ITR e IBR coletados no dia 04 pós IAM nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST .....	71
<b>Figura 16</b>	Sensibilidade barorreflexa espontânea (Alfa LF) no dia 04 pós IAM nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST .....	71

<b>Figura 17</b>	Balanço simpático-vagal global (LF/HF) no dia 04 pós IAM nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST .....	72
<b>Figura 18</b>	Fração de ejeção do VE medida por meio da ecocardiografia no dia 04 pós IAM .....	74
<b>Figura 19</b>	Área de infarto medida por meio da ecocardiografia no dia 04 pós IAM .....	74
<b>Figura 20</b>	Relação E/E' medida por meio da ecocardiografia no dia 04 pós IAM .....	75
<b>Figura 21</b>	Fotomicrografia de um corte histológico (corado com HE) obtido da área do infarto .....	76
<b>Figura 22</b>	Fotomicrografias representativas da zona de reparo dos corações dos animais do grupo IAM (em A) e IAM+EST (em B) .....	76
<b>Figura 23</b>	Corte histológico de coração de animal SHAM, corado com Picrossírios-hematoxilina .....	78
<b>Figura 24</b>	Corte histológico de coração de animal IAM, corado com Picrossírios-hematoxilina .....	78
<b>Figura 25</b>	Corte histológico de coração de animal IAM+EST, corado com Picrossírios-hematoxilina .....	79
<b>Figura 26</b>	Percentual de colágeno na lesão nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST .....	79
<b>Figura 27</b>	Número de macrófagos M1 por campo na região peri-lesão dos grupos IAM e IAM+EST .....	80
<b>Figura 28</b>	Imuno-histoquímica para marcação de células CD68+, macrófagos M1. Padrão observado de distribuição de infiltrado de macrófagos M1 em tecido cardíaco infartado para os grupos IAM (A) e IAM+EST (B) .....	81
<b>Figura 29</b>	Número de macrófagos M2 por campo na região peri-lesão dos grupos IAM e IAM+EST	81
<b>Figura 30</b>	Imuno-histoquímica para marcação de células CD206+, macrófagos M2 .....	82
<b>Figura 31</b>	Atividade da SOD nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST .....	83
<b>Figura 32</b>	TBARS nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST .....	84

<b>Figura 33</b>	Conteúdo de proteínas oxidadas (carbonilas) nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST .....	84
<b>Figura 34</b>	Concentração de ânion superóxido nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST .....	85
<b>Figura 35</b>	Resumo dos principais resultados do estudo .....	114

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Parâmetros hemodinâmicos coletados no dia 04 pós IAM nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST .....	69
<b>Tabela 2</b> - Parâmetros de VIP e de VPA coletados no dia 04 pós IAM nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST .....	70
<b>Tabela 3</b> - Parâmetros ecocardiográficos coletados no dia 03 dia pós IAM nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST .....	73
<b>Tabela 4</b> - Números de macrófagos por campo nos grupos IAM e IAM+EST	80
<b>Tabela 5</b> - Marcadores sistêmicos de estresse oxidativo nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST .....	83

**RESUMO**

---

Schmidt, R. *Efeitos da estimulação elétrica do nervo depressor aórtico na modulação da resposta inflamatória pós infarto agudo do miocárdio em ratos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

O desenvolvimento de insuficiência cardíaca após infarto agudo do miocárdio (IAM) está intimamente associado com alterações profundas na geometria, estrutura e função cardíaca, conhecido por "remodelamento ventricular". Um crescente número de evidências sugere que uma resposta inflamatória acentuada ou prolongada pós-infarto resulta em um remodelamento patológico, comprometendo a função ventricular esquerda que se configura como um dos principais preditores de mortalidade após infarto agudo do miocárdio. Estudos recentes têm investigado a modulação da inflamação pelo sistema autonômico, principalmente por meio da estimulação vagal (elétrica e medicamentosa), possibilitando uma nova abordagem terapêutica para a modulação da inflamação no IAM. Nesse sentido, o presente estudo avaliou o efeito da estimulação elétrica dos aferentes barorreceptores na modulação autonômica e o possível efeito da mesma na modulação da resposta inflamatória pós infarto agudo do miocárdio em ratos. Os animais foram divididos em 3 grupos: **Grupo Sham (SHAM)**: 5 animais não infartados sem tratamento; **Grupo infartado não estimulado (IAM)**: 10 animais infartados sem tratamento e **Grupo infartado e estimulado (IAM+EST)**: 10 animais infartados tratados com estimulação elétrica do nervo depressor aórtico (NDA). Foram realizadas cinco sessões de 30 min de estimulação do NDA entre os dias 1 e 3 pós IAM. A corrente elétrica aplicada foi capaz de reduzir a PAM durante o período da estimulação em mais de 30 mmHg e não houve diferença de resposta ao estímulo elétrico quando comparados os três dias de sessões. A relação LF/HF, que reflete o equilíbrio simpático-vagal global, apresentou-se elevada no grupo IAM ( $0,36 \pm 0,066$ ) quando comparada aos grupos SHAM ( $0,18 \pm 0,015$ ) e IAM+EST ( $0,16 \pm 0,022$ ). Dessa forma, foi possível observar que os parâmetros HF e LF, importantes indicadores da função autonômica, foram semelhantes entre os grupos SHAM e IAM+EST, demonstrando efeito benéfico da estimulação elétrica do NDA na manutenção da modulação autonômica. A sensibilidade barorreflexa (BPM/mmHg) ficou diminuída no grupo IAM (ITR= $1,44 \pm 0,20$ ; IBR= $-0,82 \pm 0,15$ ) quando comparado com o grupo SHAM (ITR= $2,79 \pm 0,58$ ; IBR= $-1,10 \pm 0,43$ ). O grupo IAM+EST apresentou uma melhor sensibilidade barorreflexa induzida (ITR= $3,40 \pm 0,18$ ; IBR= $-3,32 \pm 0,43$ ) e espontânea em relação ao grupo IAM, sendo semelhante ou maior quando comparado ao

grupo SHAM. A função cardíaca avaliada por meio da ecocardiografia revelou uma melhor função sistólica no grupo IAM+EST (Fração de Ejeção (%)= $53\pm 3,8$ ) quando comparado ao grupo IAM (Fração de Ejeção (%)= $43\pm 2,0$ ). Analisando o percentual de colágeno na lesão, o grupo IAM apresentou valores significativamente maior ( $14,24\pm 1,75$ ) quando comparado com os grupos SHAM ( $0,85\pm 0,04$ ) e IAM+EST ( $5,35\pm 0,46$ ). A análise imuno-histoquímica mostrou uma maior concentração (número de células por campo) de macrófagos M1 no grupo IAM ( $131,13\pm 11,75$ ) em relação ao grupo IAM+EST ( $95,46\pm 16,27$ ) e um maior número de macrófagos M2 no grupo IAM+EST ( $143,69\pm 15,23$ ) quando comparado com o grupo IAM ( $96,38\pm 22,35$ ). Marcadores de estresse oxidativo indicaram um maior conteúdo carbonílico de proteínas (nmol/mg) no grupo IAM ( $2,24\pm 0,09$ ) em relação ao grupo IAM+EST ( $1,96\pm 0,07$ ). O grupo IAM+EST apresentou uma maior atividade da enzima SOD (USOD/mg) ( $5,55\pm 0,04$ ) quando comparado ao grupo IAM ( $5,16\pm 0,06$ ). Esses achados sugerem que a estimulação elétrica do NDA foi capaz de modular a resposta inflamatória pós IAM levando a um remodelamento menos patológico e melhorando os índices da função cardíaca avaliados por ecocardiografia, apresentando-se como uma nova abordagem terapêutica na prevenção do desenvolvimento de insuficiência cardíaca pós IAM.

**Descritores:** Infarto do miocárdio; Inflamação; Barorreflexo; Estimulação elétrica; Ratos; Ecocardiografia

## **ABSTRACT**

---

Schmidt, R. *Effect of electrical stimulation of the aortic depressor nerve on inflammatory response after experimental myocardial infarction in rats*. [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

The development of heart failure following acute myocardial infarction (AMI) is closely associated with deep changes in cardiac geometry, structure and function, known as "ventricular remodeling". A growing body of evidence suggests that a marked or prolonged post-infarction inflammatory response leads to a pathologic remodeling, impairing the left ventricle function that is the most important predictor of heart failure development. Recent studies have investigated the modulation of inflammation by the autonomic system, mainly by electrical or drug vagal stimulation, making possible a new therapeutic approach for the modulation of the inflammation in the AMI. Our study evaluated the effect of the electrical stimulation of the aortic depressor nerve (ADN) on autonomic modulation and the possible effect on inflammatory response post AMI. The animals were divided into 3 groups: **Sham Group (SHAM)** - 5 animals not infarcted without treatment; **Infarcted group (AMI)** - 10 infarcted animals without treatment; **Infarcted and stimulated group (AMI+EST)** - 10 infarcted animals treated with electrical stimulation of the ADN. Five sessions of 30 min of ADN stimulation were performed between days 1 and 3 post AMI. The electric current was able to reduce the median arterial pressure during the stimulation period by more than 30 mmHg in all sessions. The LF/HF ratio, which reflects the global sympathetic-vagal balance, was elevated in the AMI group ( $0.36 \pm 0.066$ ) when compared to SHAM ( $0.18 \pm 0.015$ ) and AMI+EST ( $0.16 \pm 0.022$ ). Thus, it was possible to observe that the HF and LF parameters, important indicators of autonomic function, were similar between the SHAM and AMI+EST groups, demonstrating the beneficial effect of ADN electrical stimulation on the maintenance of autonomic modulation. The baroreflex sensitivity (BPM/mmHg) was reduced in the IAM group (ITR= $1.44 \pm 0.20$ ; IBR= $-0.82 \pm 0.15$ ) when compared to the SHAM group (ITR= $2.79 \pm 0.58$ ; IBR= $1.10 \pm 0.43$ ). The IAM+EST group presented higher induced baroreflex sensitivity (ITR= $3.40 \pm 0.18$ ; IBR= $-3.32 \pm 0.43$ ) and spontaneous compared to the AMI group, being similar or higher when compared to the SHAM group. Cardiac function assessed by echocardiography revealed a better systolic function in the AMI+EST group (Ejection Fraction %= $53 \pm 3,8$ ) when compared to the AMI group (Ejection Fraction %= $43 \pm 2,0$ ). Regarding collagen deposition in the lesion (% of

collagen), the AMI group presented significantly higher values ( $14.24 \pm 1.75$ ) when compared to SHAM ( $0.85 \pm 0.04$ ) and AMI+EST ( $5.35 \pm 0.46$ ). Immunohistochemical analysis showed a higher concentration (cells per field) of M1 macrophages in the AMI group ( $131.13 \pm 11.75$ ) in comparison to the AMI+EST group ( $95.46 \pm 16.27$ ) and a higher number of M2 macrophages in the AMI+EST group ( $143.69 \pm 15.23$ ) when compared to the AMI group ( $96.38 \pm 22.35$ ). Oxidative stress markers indicated a higher carbonyl content of proteins (nmol/mg) in the AMI group ( $2.24 \pm 0.09$ ) in comparison to the AMI+EST group ( $1.96 \pm 0.07$ ). The AMI+EST group had a higher activity of the superoxide dismutase enzyme (USOD/mg) ( $5.55 \pm 0.04$ ) when compared to the AMI group ( $5.16 \pm 0.06$ ). These findings suggest that the electrical stimulation of the ADN was able to modulate the inflammatory response post AMI, leading to a less pathological remodeling and improving the indexes of the cardiac function evaluated by echocardiography, presenting as a new therapeutic approach in the prevention of heart failure development after AMI.

**Descriptors:** Myocardial infarction; Inflammation; Baroreflex; Electrical stimulation; Rats; Echocardiography.

# **1 INTRODUÇÃO**

---

As doenças cardiovasculares continuam sendo a causa número 1 de mortes no mundo, sendo responsáveis por mais de 17 milhões de óbitos em 2016 (1, 2). No Brasil, as elas são responsáveis por mais de 300 mil mortes por ano (3). A Sociedade Brasileira de Cardiologia estimou um total de 383.961 mortes por doenças cardiovasculares no Brasil no ano de 2017. Em 2013, no Brasil, as doenças isquêmicas do coração representaram 31,4% da taxa de mortalidade por doença cardiovascular (4).

Por meio de novas estratégias de reperfusão, a taxa de sobrevivência de indivíduos que sofreram um infarto agudo do miocárdio (IAM) aumentou substancialmente nos últimos trinta anos (5). No entanto, esse sucesso resultou em um maior número de pacientes que, tendo sobrevivido ao infarto agudo, passaram a ter risco de desenvolver insuficiência cardíaca (IC) (6).

A progressão do reparo após o infarto do miocárdio é muito complexa e diversas populações de células estão envolvidas, incluindo células localizadas no interior do coração, células recrutadas a partir da circulação e células de outros tecidos que participam nos processos inflamatórios e de reparo. Estas células, com os seus fatores de secreção, têm efeitos pleiotrópicos que dependem da fase de inflamação e de regeneração. Uma inflamação excessiva leva a um aumento da área de infarto, a um remodelamento patológico e, eventualmente, a uma disfunção cardíaca (7).

O desenvolvimento de IC após infarto do miocárdio está intimamente associado com alterações profundas na geometria, estrutura e função cardíaca, conhecido por "remodelamento ventricular". As alterações moleculares e celulares no remodelamento ventricular afetam tanto a área de necrose como os segmentos não infartados do ventrículo, manifestando-se clinicamente como aumento da esfericidade e dilatação ventricular, hipertrofia miocárdica e disfunção cardíaca (8).

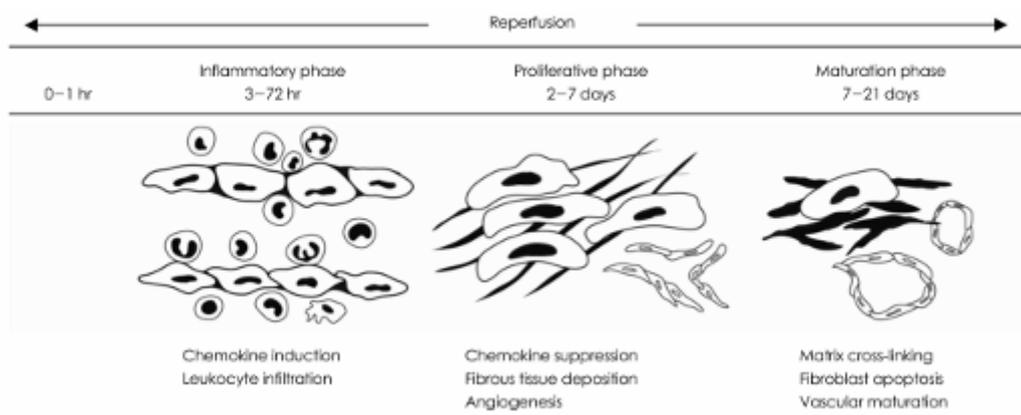
Embora a apoptose também contribua para a perda de cardiomiócitos, o mecanismo predominante de morte dos cardiomiócitos no coração infartado é a necrose de coagulação. As células, morrendo por necrose, liberam o seu conteúdo intracelular, dando início a uma intensa resposta inflamatória por meio dos mecanismos da imunidade inata (9). Uma vez ativado o sistema imune inato pelo dano cardíaco, diversos mediadores inflamatórios são liberados e células inflamatórias são atraídas para o sítio da lesão miocárdica. Todos esses fatores humorais e celulares apresentam funções distintas no processo de remodelamento (10). As células do sistema imunológico inato são grandes contribuintes à inflamação após o IAM. Lesão no local de infarto desencadeia inflamação

aguda e subsequente respostas inflamatórias, incluindo migração de neutrófilos monócitos pró-inflamatórios, digestão de necrose células e restos celulares, liberação de espécies reativas de oxigênio, e geração de estresse oxidativo. Essas sequelas ainda agravam a inflamação, mas são tipicamente seguidas pela migração e diferenciação de monócitos / macrófagos reparadores, produção de colágeno, e angiogênese, resultando na cicatrização não funcional do miocárdio infartado. O papel de cada célula imune inata, o tipo e suas contribuições na progressão do pós-infarto inflamação são discutidos abaixo.

Um crescente número de evidências sugere que uma resposta inflamatória acentuada ou prolongada pós-infarto resulta em um remodelamento patológico (9), comprometendo a função ventricular esquerda que se configura como um dos principais preditores de mortalidade após infarto agudo do miocárdio (11).

A ativação da cascata do complemento, a produção de espécies reativas de oxigênio e a resposta mediada via cascata de citocinas, desempenham um importante papel na inflamação pós infarto agudo do miocárdio (12). Dentre os mecanismos envolvidos nesse processo de reparo do miocárdio destacam-se: o aumento do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina-6 (IL-6) que podem regular a sobrevivência de miócitos e induzir inflamação celular adicional (13, 14); a produção de quimiocinas que regulam o recrutamento de leucócitos inflamatórios relacionados ao infarto do miocárdio (15); a Proteína Quimiotática de Monócitos (MCP-1)/CCL2 que desempenha um efeito potente sobre o recrutamento de macrófagos e no acúmulo de miofibroblastos (16) e o Fator de Transformação do Crescimento Beta (TGF- $\beta$ ) que é crucial no reparo cardíaco pela supressão da inflamação (17).

A figura abaixo descreve o tempo das fases do reparo no IAM experimental de ratos. Nota-se que a fase inflamatória compreende os três primeiros dias pós IAM (18).



Fonte: Frangogiannis, 2006 (18).

**Figura 1** – Fases do reparo no Infarto Agudo do Miocárdio experimental de ratos

Diante do exposto, evidencia-se que a resposta inflamatória ao infarto agudo do miocárdio é complexa e determina o tamanho da lesão, bem como a qualidade do reparo tecidual. Uma resposta inflamatória excessiva ou prolongada pode alterar o remodelamento ventricular e comprometer a função cardíaca.

Estudos recentes demonstraram que o nervo vago (principal nervo colinérgico do sistema nervoso autônomo parassimpático que conecta o SNC às vísceras), modula a resposta inflamatória não somente em desordens infecciosas, mas também em condições assépticas de reparo tecidual. Esses resultados incentivaram pesquisadores a investigar a modulação da inflamação pelo sistema autonômico, principalmente por meio da estimulação vagal (elétrica e medicamentosa), possibilitando uma nova abordagem terapêutica para a modulação da inflamação no infarto agudo do miocárdio (19).

Portanto, intervenções que aumentam a atividade parassimpática ou que aumentam a atividade da acetilcolina (ACh) podem exercer um efeito imunossupressor, inibindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias em diferentes modelos experimentais de sepsis (20-25) e inflamação asséptica (26, 27). Mais recentemente, tem-se avaliado a participação da neuromodulação sobre o remodelamento cardiovascular (28-32). Essa modulação parassimpática poderia ser direta (através de estimulação do vago) ou indireta pela administração de substâncias anticolinesterásicas que favorecem a manutenção da acetilcolina na fenda sináptica. Adicionalmente, a estimulação elétrica dos aferentes aórticos pode ser considerada uma vez que o aumento da atividade dos pressorreceptores pode inibir a atividade simpática e aumentar a parassimpática para o coração.

O papel dos pressorreceptores na modulação autonômica e controle da função cardíaca é bem discutido na literatura, mas o efeito de uma ativação dos pressorreceptores na resposta inflamatória pós infarto agudo do miocárdio ainda não está descrito.

Nesse sentido, considerando-se que a resposta inflamatória é um mecanismo determinante no processo de remodelamento ventricular após IAM; que uma resposta inflamatória intensa está associada à disfunção ventricular pós IAM; que o aumento da atividade vagal reduz a resposta inflamatória em diferentes modelos animais; que novas abordagens são necessárias para prevenir a disfunção do miocárdio após o infarto agudo do miocárdio; a hipótese do presente estudo é que a estimulação elétrica dos aferentes dos pressorreceptores poderá, por meio da modulação do sistema nervoso autônomo (redução do simpático, aumento do vago), interferir na resposta inflamatória que se segue ao IAM, e assim influenciar de maneira positiva o remodelamento cardíaco, protegendo a função do órgão.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

---

## **2.1 Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) e Remodelação Cardíaca (RC)**

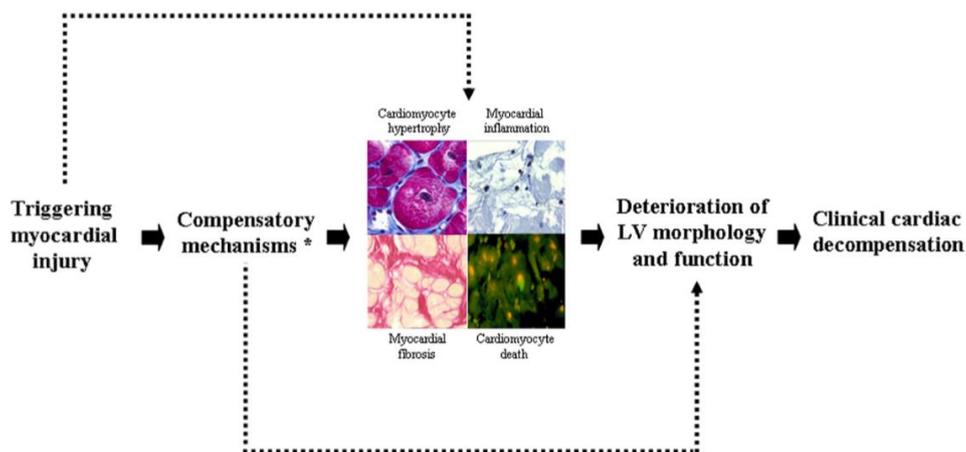
Infarto Agudo do Miocárdio é a nomenclatura dada à lesão isquêmica decorrente da redução completa ou parcial/grave do aporte sanguíneo para os cardiomiócitos, que resulta em morte celular e alterações funcionais e estruturais na área afetada, bem como no miocárdio remanescente. Dependendo da extensão e localização da área de necrose, bem como da intensidade do processo de reparação da área afetada, o prognóstico da doença pode sofrer variações substanciais (33). Usualmente, o IAM é consequência da ruptura de uma placa aterosclerótica instável, seguida da formação de um coágulo o qual obstrui a luz da artéria coronária com privação importante do suprimento sanguíneo para o miocárdio. A continuidade da isquemia leva à morte celular (necrose) e, conseqüentemente, desencadeia um processo inflamatório na área atingida. A intensidade desse processo está relacionada a diversos fatores, dentre eles o grau da lesão inicial (34).

A remodelação cardíaca é definida como um conjunto de mudanças moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, que se manifestam clinicamente por alterações no tamanho, massa, geometria e função do coração, em resposta à determinada agressão (34). Por sua vez, o termo remodelamento do miocárdio é usado para descrever uma variedade de modificações na biofisiologia do cardiomiócito, volume e composição dos compartimentos cardiomiócito e não-cardiomiócito, e a geometria e arquitetura da câmara do ventrículo esquerdo (VE) decorrente do IAM, sobrecarga de pressão ou volume, estados cardiomiopáticos e exposição a infecções ou agentes cardiotóxicos (35).

O remodelamento do miocárdio resulta de modificações que não são necessariamente adaptativas somente num primeiro momento, mas são patológicas e potencialmente sujeitas a se autoperpetuam num círculo vicioso progressivo (2 do Gonzales). Esse processo pode resultar em um mau prognóstico, pois pode acarretar alterações da energética cardíaca, comprometendo a perfusão intramiocárdica, ocasionando progressiva disfunção ventricular (deterioração da função sistólica e diastólica) e propensão a arritmias malignas (34, 36).

Portanto, o remodelamento do miocárdio é determinante no curso clínico e desfecho de várias doenças cardíacas, evoluindo para Insuficiência Cardíaca Crônica (ICC) (35), que se caracteriza como uma síndrome clínica que necessariamente reflete

uma diversidade de padrões de remodelamento estrutural miocárdico em termos quantitativos e qualitativos (37, 38) (Figura 2).



Fonte: Gonzáles et al., 2011

### Figura 2 - Patogênese da insuficiência cardíaca

O diagnóstico clínico da remodelação baseia-se na detecção de mudanças na morfologia, massa, geometria, áreas com cicatriz, fibrose e infiltrado inflamatório (8), por meio de ecocardiograma, ventriculografia e, recentemente, ressonância nuclear magnética (34, 39).

Apesar de complexo, o processo de remodelação após o infarto caracteriza-se, clinicamente, pelo aumento da cavidade ventricular (8, 39).

A detecção de marcadores celulares constitui outra forma de diagnóstico, ainda não utilizada rotineiramente na prática clínica, mas que se baseia no fato de que o processo de remodelação possa envolver a reexpressão de genes do período fetal (40, 41).

Estudos usando microarray, identificaram grupos de perfis de expressão genética que podem estar envolvidos no remodelamento estrutural do miocárdio. Tais como aqueles envolvidos na hipertrofia e morte de cardiomiócitos, inflamação, alterações da matriz de colágeno e rarefação microvascular (42, 43).

Uma das alterações usuais do remodelamento cardíaco é o aumento no conteúdo de colágeno, denominada fibrose. O colágeno fibrilar miocárdico é dividido em três

componentes que são denominados de epimísio (envolve todo o músculo cardíaco e constitui as superfícies endocárdica e epicárdica; a partir dele, grupos de miofibras interligam-se por uma rede denominada perimísio), o perimísio (grupos de fibras interligadas em rede) e o endomísio (fina rede em volta de cada miócito, ligando-os uns aos outros e aos capilares vizinhos) (34).

Quando há um aumento do colágeno envolvendo esses três componentes, há grande possibilidade de ocorrer bloqueios na condução elétrica, favorecendo o aparecimento de arritmias por reentrada. Este processo permite associar a fibrose com arritmias e risco de morte súbita (44)

É consenso de que a remodelação ventricular resulta em deterioração da função ventricular, porém os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesse fenômeno ainda permanecem desconhecidos. Dentre os potenciais fatores envolvidos nesse processo destacam-se: a morte celular, o metabolismo energético, o estresse oxidativo, a inflamação, o colágeno, as proteínas contráteis, o transporte de Cálcio, a geometria e a ativação neuro-hormonal (34).

Estudos sugerem que tanto a resposta imune adaptativa quanto a inata é ativada em resposta a lesões cardíacas. O sistema inato seria o responsável pela resposta inflamatória mais inespecífica, enquanto que o sistema adaptativo induziria respostas mais específicas (mediada pelas células B e T) (45).

Evidências experimentais mostraram que mediadores inflamatórios induzem reexpressão de enzimas do período fetal, crescimento celular, ativação de metaloproteinases, proliferação de fibroblastos e perda progressiva de miócitos por meio de apoptose. Do mesmo modo, antagonismo da resposta inata (antagonistas de toll-like receptors, TNF, IL-1 e IL-8) atenuaram o processo de remodelação após o infarto. Além disso, a modulação da resposta adaptativa (macrófagos, linfócitos T reguladores e B) pode induzir remodelação mais favorável, principalmente no modelo de isquemia miocárdica (45-47).

Uma vez ativado o sistema imune inato pelo dano cardíaco, diversos mediadores inflamatórios são liberados e células inflamatórias são atraídas para o sítio da lesão miocárdica (10). Todos esses fatores humorais e celulares apresentam funções distintas no processo de remodelamento. Citocinas como as interleucinas 1beta e o fator de necrose tumoral (TNF-alfa) estão envolvidos no processo de apoptose de cardiomiócitos e na

ativação da matriz de metaloproteinases (MMPs), e estes podem degradar a estrutura fisiológica de colágeno do miocárdio (48, 49) (Figura 2). Os fragmentos de colágeno resultantes exercem potentes ações pro-inflamatórias, enquanto MMPs também podem processar citocinas e quimiocinas que alteram suas atividades biológicas (49).

## 2.2 Cascata do Complemento

Hill & Ward, 1971(50), demonstraram que o miocárdio infartado de ratos tratados com substância inibidora de C3 não é capaz de desenvolver atividade leucocitária, sugerindo um papel não imunológico para C3 na mediação da resposta inflamatória aguda em lesão tecidual inespecífica. Em pacientes com IAM, componentes iniciais de atuação da cascata do complemento ativa a liberação de constituintes subcelulares da membrana associados à necrose miocárdica isquêmica. Tal ativação pode ser responsável, em parte, para o desenvolvimento de inflamação aguda e evolução do tamanho do infarto após oclusão da artéria coronária (51).

As proteínas do complemento são produzidas endogenamente pelo coração. A via clássica da cascata do complemento é totalmente ativada durante o IAM e está diretamente envolvida na lesão miocárdica, sugerindo que a inibição do sistema do complemento pode ser eficaz no tratamento do IAM (52).

Nesse sentido, Weisman et al., 1990 (53), em um modelo de isquemia e reperfusão do miocárdio de rato, mostrou que a infusão solúvel do receptor de complemento humano tipo 1 (sCR1) suprimiu significativamente a inflamação pós-infarto e reduziu a área de infarto em 44%. Apesar dos resultados experimentais promissores, estudos clínicos recentes, testando os efeitos da inibição do complemento em pacientes com infarto agudo do miocárdio, apresentaram resultados decepcionantes. A administração de Pexelizumab, um inibidor do complemento C5, em pacientes com infarto agudo do miocárdio, não teve efeito significativo sobre o tamanho do infarto e sobre desfechos clínicos adversos (54-56).

### 2.3 Espécies Reativas de Oxigênio

O Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é capaz de sozinho induzir a produção de TNF- $\alpha$  pelo miocárdio e provocar lesão cardíaca por mecanismo dependente de MAPK (57). Espécies reativas de oxigênio podem gerar um estímulo leucocitário, como a ativação do sistema complemento, indução da expressão de P-selectina induzida por choque hemorrágico, regulação positiva de quimiocinas e um aumento na concentração da molécula de adesão endotelial intercelular (ICAM)-1 que resulta em maior aderência de PMN (58-61).

Jolly, Kane, Bailie, Abrams, & Lucchesi, 1984(62), demonstraram que o uso de enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase, reduziu o tamanho da área de infarto em cães com isquemia e reperfusão do miocárdio. No entanto, alguns estudos evidenciaram que o tratamento com antioxidantes não é capaz de reduzir a área de lesão em um infarto agudo do miocárdio (63-65).

Estudos clínicos mostraram que pacientes com infarto agudo do miocárdio, submetidos à intervenção coronária percutânea ou trombólise e tratados com superóxido dismutase humana recombinante não apresentaram melhora significativa da função ventricular esquerda(66, 67).

### 2.4 Amplificação de citocinas e quimiocinas

As citocinas podem amplificar-se através de um *feedback* positivo. O aumento do TNF- $\alpha$  no infarto do miocárdio pode regular positivamente os níveis de TNF- $\alpha$  no miocárdio normal vizinho, levando a amplificação de efeitos (13). O TNF- $\alpha$  estimula a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão pelos leucócitos e células endoteliais e regula o metabolismo da matriz extracelular, reduzindo a síntese de colágeno e reforçando a atividade da metaloproteinases de matriz extracelular (MPP) nos fibroblastos cardíacos (68), outras citocinas de adesão, tais como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), também é induzida no miocárdio isquêmico e reperfundido de cães. Kumar et al., 1997 (69), sugeriram um papel importante da MCP-1 no tráfico de monócitos no miocárdio reperfundido. Em modelo de infarto em rato a MCP-1 é igualmente regulada positivamente (70). Quando o modelo de infarto foi em

ratos MCP-1  $-/-$  (knockout), a expressão do RNA mensageiro para as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  e IL-10 foi reduzida, apresentando uma diferenciação defeituosa de macrófagos (71).

Pesquisadores têm demonstrado uma forte indução de várias quimiocinas no miocárdio infartado e seu papel no recrutamento leucocitário (15).

A regulação positiva de quimiocinas é uma característica marcante da resposta inflamatória pós infarto do miocárdio e evidências indicam que essas quimiocinas, além de sinalizar a ativação e quimiotaxia leucocitária, estão envolvidas na regulação da angiogênese e deposição de tecido fibroso no miocárdio infartado (71). Essa liberação e indução acontece rapidamente na zona central durante o infarto, contudo é usualmente máxima na borda da mesma (13, 72).

Uma robusta regulação positiva de citocinas e quimiocinas pode voltar ao nível basal se o infarto é pequeno, mas se o infarto é grande e a resposta inflamatória é excessiva, pode haver uma sustentada regulação positiva dessas substâncias, o que corresponde a uma fase de remodelamento crônico (12).

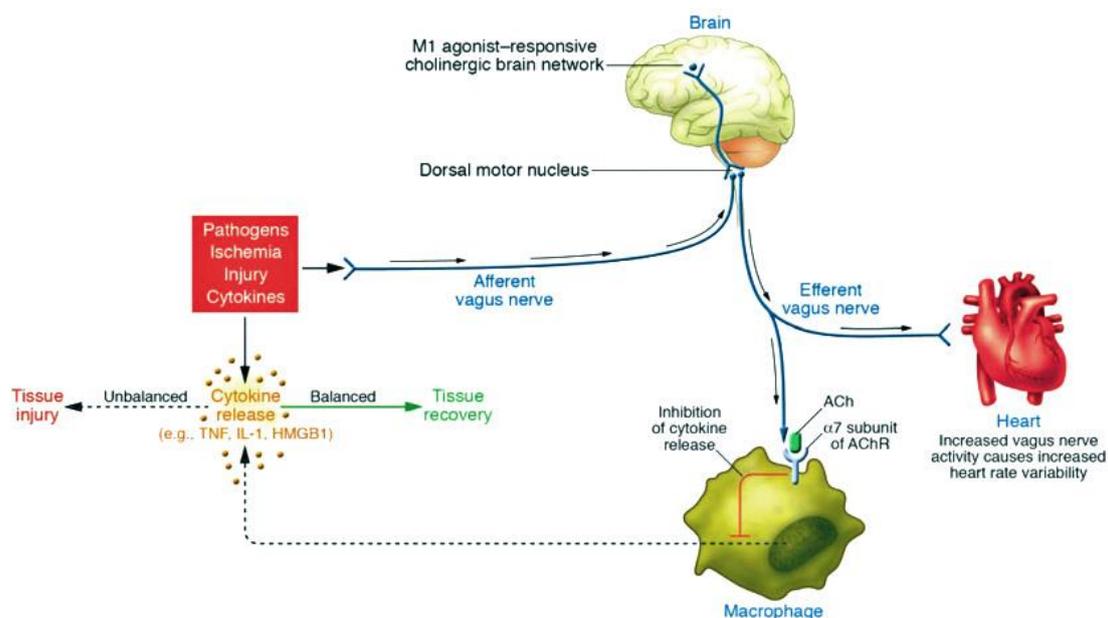
## **2.5 Resposta inflamatória celular no infarto – Neutrófilos e Monócitos**

Os neutrófilos são recrutados durante a fase inicial da lesão isquêmica cardíaca. A transmigração de neutrófilos no miocárdio infartado requer interações adesivas com células vasculares endoteliais ativadas. Os neutrófilos podem secretar oxidantes e proteases e possivelmente expressar mediadores capazes de amplificar o recrutamento celular(73). A depleção de neutrófilos em animais submetidos a infarto do miocárdio reperfundido, mostrou-se capaz reduzir significativamente o tamanho do infarto, sugerindo que uma quantidade significativa da lesão do miocárdio pode ser induzida por mecanismos dependentes de neutrófilos(74, 75). Birdsall et al., 1997 (15), sugeriram que os neutrófilos podem prejudicar diretamente as células do parênquima através da liberação de produtos tóxicos específicos. Um estudo experimental demonstrou que os anticorpos monoclonais contra P-selectina teriam reduzido a área de necrose miocárdica, preservando a função endotelial coronária e atenuando a infiltração de neutrófilos na isquemia e reperfusão do miocárdio (76).

Como mencionado anteriormente, MCP-1/CCL2 desempenha um papel importante no recrutamento dos monócitos para o miocárdio infartado (16). As citocinas, tais como TGF- $\beta$ , radicais livres de oxigênio, o complemento, e quimiocinas, podem também desempenhar um papel na infiltração de monócitos. A infiltração de monócitos no miocárdio infartado é seguida pela maturação e diferenciação dessas células derivadas do sangue em macrófagos (12).

## 2.6 Via anti-inflamatória colinérgica

Tracey, 2002 (24), postulou um modelo de controle da inflamação pelo sistema nervoso central. Nesse modelo (Figura 3), sinais eferentes do nervo vago, controlados por redes cerebrais, inibem a produção de citocinas por meio das vias dependentes da subunidade  $\alpha 7$  do AchR nos macrófagos e outras células, bem como aumentam a variabilidade instantânea da frequência cardíaca. Uma rede cerebral colinérgica responsiva aos agonistas M1 pode aumentar a atividade da via anti-inflamatória colinérgica e também aumentar a variabilidade instantânea da frequência cardíaca.



Fonte: Tracey, 2002 (24).

**Figura 3** – Reflexo Inflamatório

O nervo vago é uma extensão primitiva do sistema nervoso central que atinge órgãos do sistema retículo-endotelial tais como o baço e fígado, principais fontes de citocinas. Além disso, algumas de suas fibras aferentes são capazes de transmitir informações ao cérebro iniciando febre e outras respostas à lesões ou infecções (77, 78). Isso poderia servir como um braço sensorial do reflexo inflamatório, onde sinais inflamatórios aferentes ativam uma resposta vagal eferente que inibe a produção de citocinas a fim de limitar ou evitar danos (24).

Uma descoberta acidental revelou que uma administração intracerebral de uma molécula que inibiu a produção de TNF também aumentou a atividade eferente do nervo vago e inibiu a inflamação fora do SNC (21). A estimulação do nervo vago diminuiu significativamente a liberação de TNF em animais que receberam doses letais de endotoxina (22). Trabalhos subsequentes estabeleceram que a sinalização do nervo vago inibe a atividade de citocinas e melhora o desfecho de doenças em modelos animais de sepse, isquemia/reperfusão, choque hemorrágico, isquemia miocárdica, íleo, artrite experimental e pancreatite (21, 26, 79-84).

O mecanismo molecular da inibição da síntese de citocinas é atribuído a acetilcolina (ACh), o principal neurotransmissor do nervo vago (22, 85). Os macrófagos e outras células produtoras de citocinas expressam receptores de acetilcolina (AChRs) que transduzem um sinal intracelular inibindo a síntese de citocinas (85). Ratos com deficiência de subunidade  $\alpha 7$  do AchR ou com vagotomia, apresentam uma resposta inflamatória desequilibrada com produção excessiva de TNF quando expostos a endotoxina (80). A estimulação vagal não inibe a produção de citocinas em ratos com bloqueio da subunidade  $\alpha 7$  do AchR, enquanto que nos ratos sem esse bloqueio a estimulação vagal diminui de forma significativa a síntese de citocinas pro-inflamatórias (25).

Portanto, intervenções que aumentam a atividade parassimpática ou que aumentam a atividade da acetilcolina podem exercer um efeito imunossupressor, inibindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias em diferentes modelos experimentais de sepse (20-25) e inflamação asséptica (26, 27). Mais recentemente, tem-se avaliado a participação da neuromodulação sobre o remodelamento cardiovascular (28-32).

## **2.7 O barorreflexo**

Os barorreceptores são mecanorreceptores que monitoram a pressão arterial batimento a batimento e estão localizados no arco aórtico, seio carotídeo e outros grandes vasos. Esses mecanorreceptores induzem uma resposta reflexa aumentando o drive parassimpático e diminuindo o drive simpático para manter a pressão arterial em níveis praticamente constantes (86, 87). A ativação barorreflexa é considerada uma promissora abordagem terapêutica para pacientes com hipertensão resistente (88-91). Estudos clínicos mostraram que pacientes hipertensos possuem uma função barorreflexa atenuada (92-94) associada com um alto perfil inflamatório (95-97). Esses resultados sugerem que a disfunção barorreflexa pode facilitar a inflamação em indivíduos hipertensos.

## **2.8 Estimulação do Nervo Depressor Aórtico**

A estimulação elétrica de aferentes dos barorreceptores é uma técnica amplamente utilizada em vários estudos sobre controle barorreflexo. No rato, o nervo depressor aórtico (NDA) foi amplamente utilizado porque o nervo do seio carotídeo é muito pequeno, difícil de manipular e tem fibras aferentes de baro e quimiorreceptores. Krieger e Marseillan (98), identificaram as vias seguidas pelas fibras do NDA na região cervical de ratos Wistar anestesiados por meio de registros eletroneurográficos combinados com estimulação elétrica. Outros estudos demonstraram, por meio de estimulação elétrica, que o NDA de ratos Sprague-Dawley e Wistar possuía quase exclusivamente fibras aferentes barorreceptoras e poucas ou inexistentes fibras funcionais aferentes quimiorreceptoras (99, 100). Esses resultados estabeleceram que a estimulação elétrica do NDA de ratos é um método confiável para desencadear a ativação do barorreflexo em estudos cardiovasculares.

Aumentando a intensidade dos impulsos elétricos aplicados, a estimulação elétrica permite o controle do sinal aferente transmitido para o sistema nervoso central por meio de recrutamento de fibras nervosas adicionais: fibras A mielinizadas são ativadas com intensidades mais baixas e fibras C não mielinizadas são ativadas com intensidades elevadas (100-106).

A relação entre a frequência de estímulo do NDA e resposta reflexa é diferente para fibras A mielinizadas e fibras C não mielinizadas no rato. Toda a gama de respostas reflexas ocorrem, aproximadamente, entre 1 e 10 Hz para a estimulação das fibras C e entre 15 e 100 Hz para estimulação das fibras A mielinizadas(104, 106).

Considerando o exposto, nossa hipótese de trabalho no presente estudo é de que a estimulação elétrica aferente do NDA pode reduzir a resposta inflamatória no miocárdio de ratos submetidos à oclusão coronariana e dessa forma modificar favoravelmente o curso das alterações fisiopatológicas que se seguem a essa oclusão. Adicionalmente, essa “proteção” está associada com a modulação periférica do sistema nervoso autônomo (aumento da modulação vagal/redução da modulação simpática) após integração central provocada pela estimulação aferente do NDA.

### **3. OBJETIVOS**

---

### 3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da estimulação elétrica do Nervo Depressor Aórtico sobre a resposta inflamatória na fase aguda do infarto do miocárdio experimental em ratos.

### 3.2 Objetivos específicos

#### Parte I – Protocolo experimental

- Realizar cinco sessões de trinta minutos de estimulação do NDA de ratos infartados entre os dias 01 e 03 pós IAM com pelo menos 20 mmHg de redução na PAM durante a estimulação;
- Avaliar em ratos submetidos à ligadura da coronária esquerda, tratados ou não com estimulação elétrica do NDA, os seguintes parâmetros:

#### **No terceiro dia pós IAM:**

- Função sistólica, diastólica, e área de hipo/acinesia do ventrículo esquerdo, obtidos por meio do exame de ecoDopplercardiografia;

#### **No quarto dia pós IAM:**

- Valores hemodinâmicos, variabilidade do intervalo de pulso e variabilidade da pressão arterial, inferidas por meio da análise de curvas de pressão arterial registradas de forma direta (intra-arterial);

- Histopatologia da lesão e organização e distribuição das fibras de colágeno

- Concentração plasmática de parâmetros relacionados ao estresse oxidativo avaliados por meio da espectrofotometria;

- A presença de células CD68+ e CD206+ no ventrículo esquerdo (região peri-infarto), por meio da técnica de imuno-histoquímica;

#### Parte II – Revisão Sistemática

- Elaborar uma revisão sistemática (Cochrane – único autor) intitulada “Safety and Efficacy of Baroreflex Activation Therapy for Heart Failure: A rapid systematic review”.

## **4. MÉTODOS**

---

Esse estudo foi iniciado após sua aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA SDC 4052/14/032) (Anexo 1).

#### **4.1 Animais e grupos experimentais**

Para realização deste estudo foram utilizados 25 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, adultos, com peso variando entre 260 g e 300 g, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos no Biotério da Divisão de Experimentação do Instituto do Coração, em condições sanitárias de biotério convencional, com controle de temperatura (22 a 24 °C) e controle de luminosidade (12h de claro e 12h de escuro).

A ração fornecida foi a Nuvilab da marca Nuvital, peletizada e que preenche todas as necessidades nutricionais dos roedores. O manejo dos animais obedeceu aos princípios éticos da experimentação animal da Sociedade Brasileira da Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA).

Os animais foram separados em 3 grupos: 1 grupo controle e 2 grupos infartados.

**Grupo Sham (SHAM):** 5animais não infartados sem tratamento

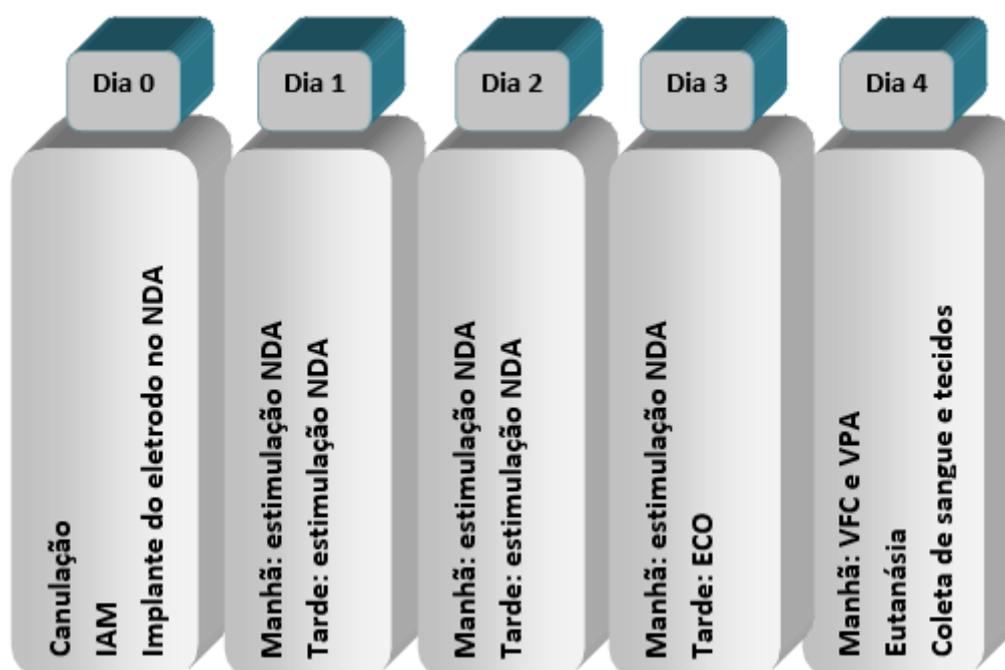
**Grupo infartado não estimulado (IAM):** 10 animais infartados sem tratamento

**Grupo infartado e estimulado (IAM+EST):**10 animais infartados tratados com estimulação elétrica do NDA.

#### **4.2 Sequência Experimental**

A canulação da artéria femoral, o IAM e a implantação do eletrodo no NDA para estimulação elétrica foram realizados no dia “0”. Nos dias “1” e “2” os animais receberam duas sessões de trinta minutos de estimulação do NDA sem anestesia, ou seja, acordados (uma sessão pela manhã e outra à tarde). No dia “3”, pela manhã, os animais foram submetidos à última sessão de estimulação do NDA. No período da tarde, desse mesmo dia, foi realizado o exame de eco Dopplercardiografia com o animal anestesiado para

determinação das funções sistólicas e diastólicas cardíacas. No dia “4”, pela manhã, foram realizados os registros das curvas de pressão arterial (para posterior análise do comportamento da PA, da variabilidade da PA, da FC e variabilidade do intervalo de pulso) com o animal acordado. No período da tarde do quarto dia, os animais foram submetidos à eutanásia para retirada de sangue e tecidos de acordo com protocolos já estabelecidos - coleta de sangue por meio da cânula femoral, seguida de administração de anestésico para perfusão do animal com solução de cloreto de potássio (Figura 4).



**Figura 4** – Sequência Experimental.

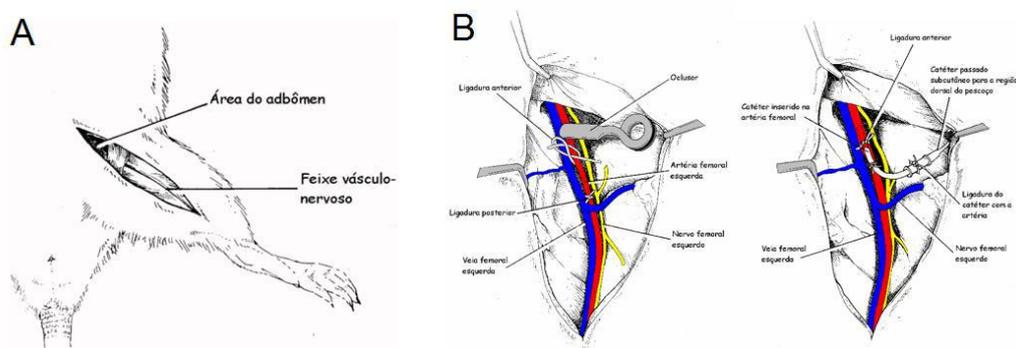
IAM=Infarto Agudo do Miocárdio; NDA=Nervo Depressor Aórtico; ECO=Ecocardiografia; VFC=Variabilidade da Frequência Cardíaca; VPA=Variabilidade da Pressão Arterial

### 4.3 Canulação da Artéria e Veia Femoral

No dia “0”, os animais foram submetidos à implantação de um cateter de polivinil na artéria e na veia femoral. Os cateteres foram confeccionados em tubo de polivinil Tygon (15 cm) tendo uma das extremidades conectada a outro tubo de polivinil com diâmetro menor (PV – 10) e 5 cm de extensão. Os ratos foram anestesiados por meio de

inalação de Isoflurano a 2% em um fluxo de oxigênio de 0,8 l/min. O animal foi colocado em decúbito dorsal e a tricotomia foi feita na região medial do membro posterior esquerdo. Após a realização da incisão, os cateteres foram inseridos na veia e artéria femoral, passado subcutaneamente e exteriorizados no dorso do animal, próximo à região cervical (Figura 5).

Foram administrados 2mg/Kg de Cloridrato de Tramadol de oito em oito horas como analgésico após canulação até o dia 2 pós IAM.



**Figura 5** – Região de dissecção para a cateterização da artéria e veia femoral (A) e isolamento da artéria femoral e inserção do cateter (B)

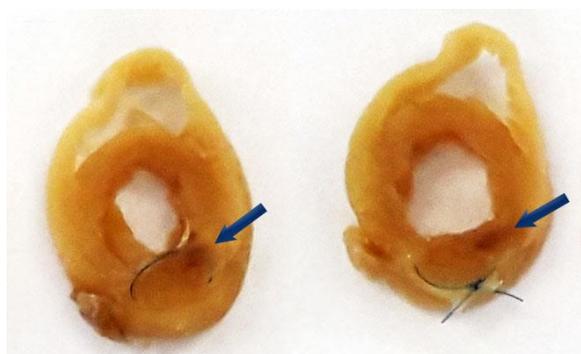
#### 4.4 Modelo Experimental de IAM

A indução do infarto do miocárdio foi realizada sob anestesia inalatória com 2% de Isoflurano em um fluxo de oxigênio de 0,8 l/min. Após o animal ser intubado e colocado em ventilação mecânica (Intermed, Inter 3, São Paulo, SP) foi realizada uma toracotomia esquerda no 4º espaço intercostal. O pericárdio foi aberto e o átrio esquerdo afastado para visualização da veia interventricular anterior como referência à artéria. Posteriormente induziu-se o IAM através da ligadura da artéria interventricular anterior, à 2-3 mm da ponta do átrio esquerdo, com um fio prolene 6-0 (Figuras 6 e 7). A realização bem sucedida do infarto foi constatada pela observação do desenvolvimento de uma cor pálida no miocárdio distal à região da ligadura (107).



Fonte: Laboratório de Hipertensão experimental. InCor-FMUSP

**Figura 6** – Cirurgia de ligadura da artéria coronária para indução do IAM.

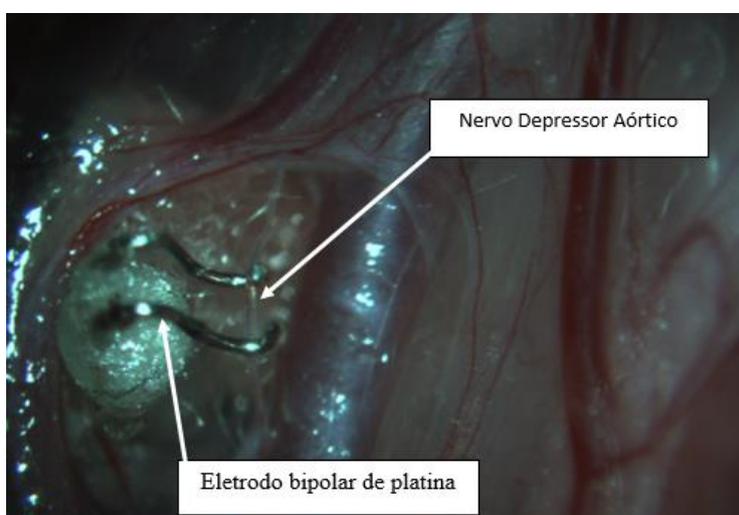


**Figura 7** - Aspecto macroscópico de duas fatias consecutivas obtidas de um mesmo coração, por secção transversal, mostrando a região do infarto (setas) na parede ventricular. Na esquerda, observa-se o fio de sutura introduzido no endocárdio e, à direita, o nó realizado em posição adjacente ao epicárdio.

#### 4.5 Implantação do eletrodo e estimulação elétrica do Nervo Depressor Aórtico

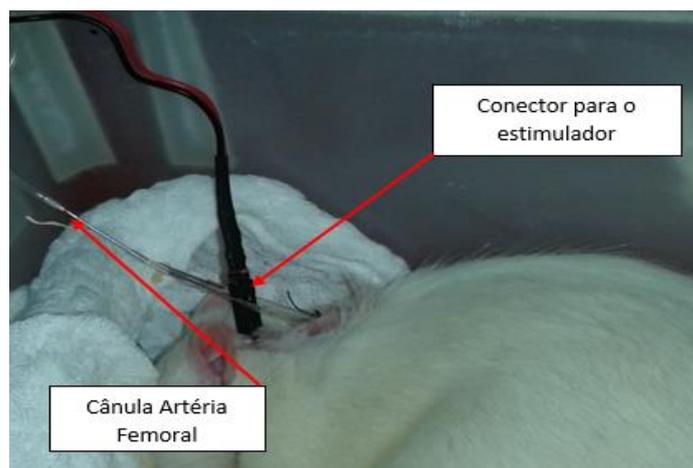
Na tarde do dia “0”, os animais foram encaminhados para a implantação do eletrodo no NDA. Uma porção de 4-6 mm do NDA esquerdo do rato foi cuidadosamente isolada abaixo da sua junção com o nervo laríngeo superior e colocada sobre um eletrodo de platina-iridium bipolar (A-M Systems™-Bare Diameter 25,4 $\mu$ m; Coated Diameter 33,02 $\mu$ m) com uma distância entre os eletrodos de 2mm (Figura 8). A correta identificação do nervo foi confirmada por seu padrão típico de descarga sincronizada com a pressão de pulso arterial. O NDA foi então coberto com material de impressão de

silicone (Super-Dent; CarlisleLaboratories, Rockville Center, NY). Após um período de trinta minutos, suficiente para a polimerização completa do material de moldagem de silicone, a atividade do nervo foi gravada novamente para verificar a integridade do sinal. Uma vez que a integridade do sinal foi confirmada, a outra extremidade do eletrodo foi exteriorizada no dorso do animal, na região cervical, e soldada a um pequeno conector (Microtech, Inc- modelo GF-2) para ser ligado a um estimulador elétrico (A-M Systems™ - Model 2100 Isolated Pulse Stimulator) (Barale et al., 2007).



**Figura 8** – Implantação do eletrodo bipolar de platina.

Foram realizadas cinco sessões de estimulação do NDA com duração de 30 minutos cada, duas no dia “1” (manhã e tarde), duas no dia “2” (manhã e tarde) e uma na manhã do dia “3” pós IAM. Durante os trinta minutos da sessão, o NDA dos animais foi submetido a uma corrente elétrica não polarizada, balanceada, com duração de pulso de 0,2 ms e frequência de 20 Hz e intensidade de 0,8 mA. A corrente foi administrada de forma contínua por trinta minutos, com intensidade suficiente para produzir uma redução de pelo menos 20 mmHg na PAM do rato acordado. Durante todo o período de estimulação, o rato permanecia acoplado por meio da cânula femoral ao sistema de aquisição de sinais para monitorização da pressão arterial em tempo real (108) (Figura 9).



**Figura 9** – Sessão de estimulação do NDA com registro da pressão arterial no rato acordado.

#### **4.6 Valores hemodinâmicos, Variabilidade da Pressão Arterial e Variabilidade dos Intervalos de Pulso**

Os valores de pressão arterial (PA), variabilidade da PA (VPA), frequência cardíaca (FC) e variabilidade do intervalo de pulso (VIP) foram calculados com as curvas de pressão registradas no quarto dia após o IAM, com o animal acordado.

A cânula arterial foi conectada a um transdutor eletromagnético (BloodPressure XDCR; Kent Scientific, Torrington, CT) que, por sua vez, estava conectada a um pré-amplificador (Stemtech). Sinais de curvas de pressão foram gravados durante um período de 30 minutos em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (Windaq, 2-kHz, DATAQ, Springfield, OH), permitindo análise dos pulsos de pressão, batimento-a-batimento, com uma frequência de amostragem de 2000 Hz. Os valores de frequência cardíaca foram derivados do sinal pulsátil da pressão arterial (107).

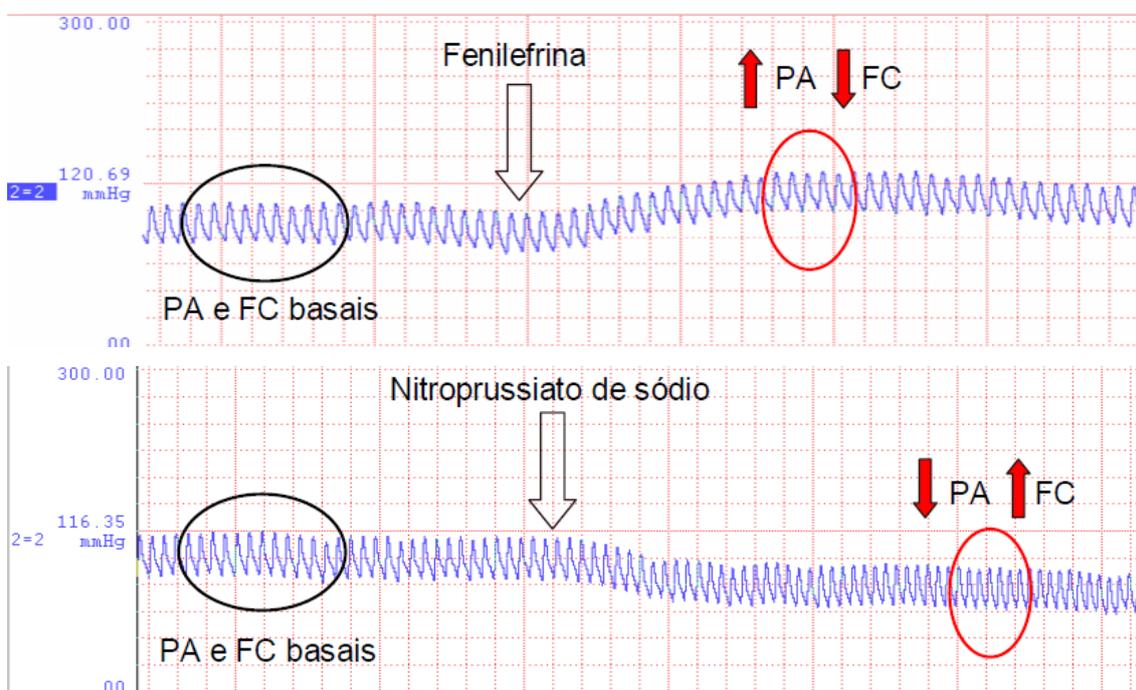
Cada batimento cardíaco foi identificado através da utilização de algoritmo implementado no Windaq/DATAC que, automaticamente, realiza a detecção dos intervalos R-R da onda do evento sistólico e da onda do sinal de pressão arterial. Após esta leitura automática, foi realizada uma verificação por inspeção visual, para identificar e/ou corrigir alguma marcação incorreta.

Em seguida foi gerada a série temporal de cada sinal a ser estudado, isto é, o intervalo de pulso cardíaco (tacograma) e da pressão arterial sistólica (sistograma). Os dados foram armazenados em arquivos e utilizados posteriormente para a análise da variabilidade no domínio do tempo e no domínio da frequência. Os índices baseados na medida dos intervalos RR individualmente, como o desvio-padrão da média de todos os intervalos RR normais, expresso em milissegundos (SDNN), representam a variabilidade global e refletem a atividade de ambos, parassimpático e simpático (Akselrod et al., 1981). A variável raiz quadrada da média das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes (RMSSD), expressa em milissegundos, ou seja, o desvio-padrão das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes, reflete predominantemente a modulação vagal para o coração. A faixa de frequência de interesse para análise espectral no rato encontra-se no intervalo que vai de 0 até 3Hz (109-111). A potência espectral foi integrada em três faixas de frequência de interesse: altas frequências (HF) entre 0,75 e 3,0 Hz, baixas frequências (LF) entre 0,20 e 0,75 Hz e muito baixas frequências (VLF) menores que 0,20 Hz. Devido ao tempo determinado de coleta dos sinais de interesse para a análise espectral, esse estudo não aborda as VLF.

#### **4.7 Avaliação do Reflexo Pressorreceptor**

Após o registro da PA e os animais terem permanecido em condições de repouso por 30 minutos, a sensibilidade dos pressorreceptores foi testada através da infusão de fenilefrina e, logo após, de nitroprussiato de sódio. A fenilefrina (Sigma ChemicalCompany, St. Louis, MO, EUA), um potente estimulador  $\alpha_1$  cuja ação predominante se dá nas arteríolas periféricas causando vasoconstrição, foi injetada em doses crescentes na cânula da veia femoral. Tal fármaco foi utilizado, portanto, para causar aumento da pressão arterial, efeito que provoca bradicardia reflexa subsequente, comandada pelos pressorreceptores. O efeito contrário, redução da pressão arterial com resposta taquicárdica, também comandada pelos pressorreceptores, foi provocado pela injeção de doses crescentes de nitroprussiato de sódio (Sigma ChemicalCompany, St. Louis, MO, EUA), um potente vasodilatador tanto de arteríolas como de veias cuja ação se dá por meio da ativação da guanilato ciclase e aumento da síntese de 3', 5'-guanosina monofosfato (GMP cíclico) na musculatura lisa dos vasos e outros tecidos (Figura 10).

Para avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores, o pico máximo ou mínimo da PAM foi reduzido dos valores de PAM do período controle. Da mesma forma, a variação máxima da frequência cardíaca foi reduzida dos valores de frequência cardíaca do período controle, imediatamente antes da infusão das drogas, para posterior quantificação das respostas. A sensibilidade barorreflexa foi avaliada pelo índice calculado através da divisão da variação da FC pela variação da PAM.



Fonte: Laboratório de Hipertensão experimental. InCor-FMUSP

**Figura 10** - Registro da PA e da FC antes e após a administração de drogas vasoativas. Ilustra o comportamento da pressão arterial e da frequência cardíaca (setas vermelhas) após a injeção de drogas vasoativas (setas pretas). PA=Pressão Arterial; FC= Frequência Cardíaca

#### 4.8 Avaliação da área infartada e da função cardíaca por meio da ecocardiografia

O exame ecocardiográfico foi realizado no terceiro dia pós infarto para a quantificação da área infartada e avaliação da função ventricular, seguindo as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia(112). Foi utilizado o equipamento SEQUOIA 512 (ACUSON Corporation, Mountain View, CA), com transdutor de 15 MHz. As imagens foram feitas a uma frequência de 13,0 MHz, para otimização da resolução e penetração do animal. Para a aquisição das imagens foi utilizado gel de transmissão para ultrassom de viscosidade média/alta (General Imaging Gel, ATL, Reedsville, USA). As imagens foram armazenadas eletronicamente. Os exames foram realizados por um único observador, com os animais anestesiados por inalação de Isoflurano a 2% em fluxo de oxigênio de 0,8 l/min. Após a sedação os animais foram colocados em decúbito dorsal, em uma mesa cirúrgica apropriada para o posicionamento do transdutor no hemitórax esquerdo do animal. A região de infarto foi delimitada de acordo com a cinética das paredes do miocárdio, avaliadas pelas seguintes janelas ecocardiográficas: longitudinal paraesternal direita, transversal (ao nível dos músculos papilares) e apical (2 e 4 câmaras). Regiões hipocinéticas (espessamento sistólico abaixo do normal), acinéticas (ausência de espessamento durante a sístole) e discinéticas (movimentação paradoxal durante a sístole) foram consideradas como infartadas. A área de acinesia foi calculada como uma relação percentual entre a área da parede sem contração (acinética) e a área total do ventrículo esquerdo em corte transversal.

A partir da visualização do ventrículo esquerdo (secção transversal) ao nível dos músculos papilares, as seguintes medidas foram realizadas: diâmetro e área diastólica final, diâmetro e área sistólica final e a espessura do septo interventricular e da parede posterior do ventrículo esquerdo durante a sístole e diástole.

As velocidades do fluxo mitral (velocidades diastólicas precoce (E), contração atrial (A), bem como a relação E/A) foram medidas pelo Doppler pulsátil no corte apical de 4 câmaras, com a amostra de volume posicionada entre as pontas das cúspides da valva mitral. Por meio do Doppler, também foi coletado o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), um importante marcador da função diastólica cardíaca. As velocidades anulares diastólicas precoce (e') e atrial (a') foram registradas pelo Doppler tecidual nos cortes apicais de quatro e duas câmaras, colocada na junção da parede do VE com quatro sítios

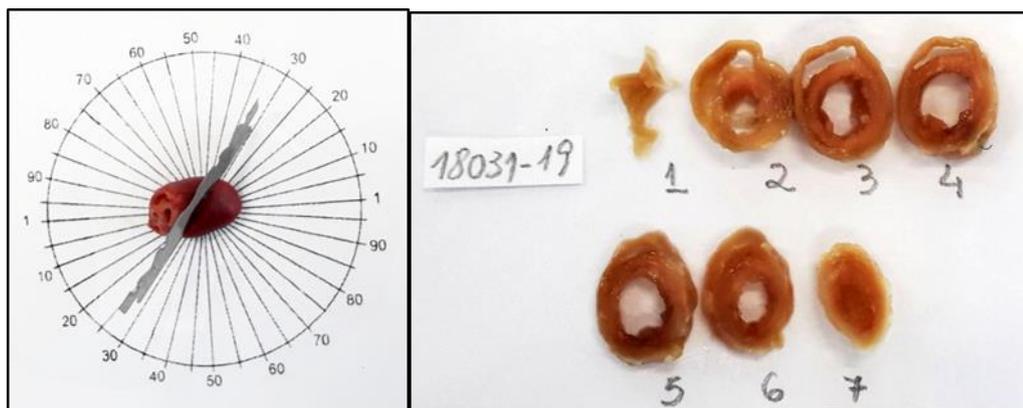
do anel mitral (septal, lateral, anterior e inferior). A média das velocidades nos quatro sítios representou as ondas e' e a' utilizadas para análise no estudo, assim como a relação E/e'. Todas as medidas representaram a média de três ciclos cardíacos.

#### **4.9 Amostragem para obtenção de cortes histológicos**

Após a coleta, os corações foram imediatamente fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato pH 7,0, por 24 horas. A seguir, foram desidratados em gradiente alcoólico (70° a 100°), diafanizados em xilol e emblocados em parafina.

Foi necessário obter cortes histológicos que passassem transversalmente ao maior eixo da lesão. Para tanto, optou-se pelo recorte do material seguindo a técnica de cortes Verticais Uniformes Randômicos (VUR). Os corações foram mantidos sob refrigeração em geladeira por 2 horas para estarem mais duros no momento do recorte de modo a conferir maior precisão de corte.

As fatias de tecido foram obtidas randomicamente, porém sempre transversais ao maior eixo do coração. Para tanto, colocou-se o órgão sobre o centro de um disco orientador com marcações de linhas radiais não equidistantes (113). Usando-se uma tabela de números randômicos determinou-se aleatoriamente uma direção para a primeira secção em cada coração. A seguir, foram obtidas fatias de 2 mm de espessura de todo o órgão, por meio de secções paralelas a essa primeira. As fatias de cada coração foram então cuidadosamente organizadas em sequência e numeradas (Figura 11).



**Figura 11** – Ilustração do procedimento para obtenção das fatias de coração, segundo o método de cortes verticais uniformes randômicos (VUR). O coração era colocado aleatoriamente sobre o disco orientador e a lâmina cortante fazia o primeiro corte no coração de acordo com a direção "sorteada" em uma tabela de números randômicos. A seguir, por meio de cortes paralelos a este primeiro corte, eram obtidas fatias de 2 milímetros de espessura de todo o órgão.

Cada uma das fatias foi identificada e incluída em um bloco de parafina, com a face de corte para baixo. Em micrótomo Leica RM2245A foram obtidos cortes histológicos de 5 $\mu$ m de cada uma das fatias de coração, em todos os casos, para a realização de estudos morfológicos e morfométricos.

As lâminas foram codificadas e o código revelado somente após a obtenção dos dados quantitativos para garantir uma análise cega.

#### 4.10 Coloração pela Hematoxilina-eosina e identificação histopatológica

Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol, hidratados em gradiente alcoólico (70° a 100°) e água e corados durante 2 minutos pela Hematoxilina de Harris. Os cortes foram então lavados em água corrente e corados com eosina durante dez minutos; a seguir, foram lavados em água corrente, desidratados em gradiente alcoólico (95° e 100°), diafanizados em xilol e montados com lamínula e entellan para análise microscópica de rotina.

#### **4.11 Coloração pelo picrossírius-hematoxilina e identificação das fibras colagênicas**

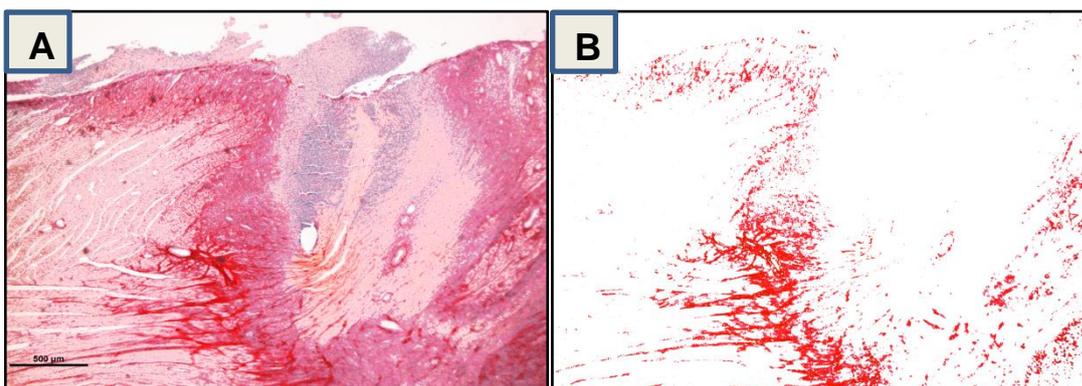
Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol, hidratados em gradiente alcoólico (70° a 100°) e água e corados durante uma hora em uma solução 0,1% de Sirius Red dissolvido em solução aquosa saturada de ácido pícrico. Os cortes foram então lavados em água corrente e contracorados com hematoxilina de Harris durante dois minutos; a seguir, foram lavados em água corrente, desidratados em gradiente alcoólico (70° a 100°), diafanizados em xilol e montados com lamínula e entellan para análise microscópica.

#### **4.12 Análise quantitativa das fibras colagênicas**

Os preparados histológicos corados com picrossírius-hematoxilina foram usados para a quantificação das fibras de colágeno.

Princípio do método: o corante Sirius Red é uma molécula alongada, com seis grupamentos sulfônicos ácidos e quatro grupamentos cromofóricos diazóticos. Demonstrou-se que os grupamentos sulfônicos do corante interagem fortemente com os aminoácidos básicos das moléculas dos diferentes tipos de colágeno, conferindo-lhe intensa cor vermelha, sendo assim muito apropriado para sua identificação em cortes histológicos (114).

As imagens analisadas foram obtidas em um microscópio de luz Nikon Optiphot, com a objetiva de 2,5x, e processadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0, de modo a selecionar, por escala de cores, apenas as fibras colagênicas, visualizadas por sua intensa coloração em vermelho (Figura 12).



**Figura 12** – Micrografia para quantificação das fibras de colágeno. (A): corte histológico corado com picrossírius-hematoxilina mostrando a região do infarto. (B): observa-se a mesma imagem após o procedimento para seleção da área ocupada por colágeno. Barra = 500µm

As imagens assim obtidas foram transferidas para o programa de análises de imagens digitais Image J (desenvolvido e disponibilizado para domínio público pelo National Institute of Health) que permitiu a estimativa da área da lesão e da área ocupada pelo colágeno na lesão. Os resultados foram expressos em porcentagem (área do colágeno/área da lesão x100).

#### 4.13 Análise qualitativa das fibras colagênicas

Utilizou-se a microscopia com luz polarizada pela sua capacidade de distinção das fibras de colágeno brilhando contra um fundo escuro nos cortes corados com picrossírius-hematoxilina, segundo Junqueira e Montes (115).

Princípio do Método: A coloração pelo Picrossírius faz com que uma grande quantidade de moléculas do Sirius Red disponha-se paralelamente às moléculas do colágeno, o que promove um aumento considerável da birrefringência das fibras de colágeno quando observadas na microscopia com luz polarizada. O fenômeno do aumento da birrefringência ocorre exclusivamente com o colágeno. Além de se mostrarem fortemente birrefringentes, as fibras que contêm colágeno assumem cores e intensidades de birrefringência variadas, resultantes dos diferentes graus de agregação física dos diferentes tipos de colágeno (115). Dessa forma, fibras finas, como as presentes no tecido

de granulação jovem, são reveladas como estruturas esverdeadas fracamente birrefringentes, enquanto as fibras grossas, que caracterizam lesões fibróticas maduras, definem-se por sua forte birrefringência de coloração amarela a vermelha (116, 117).

#### **4.14 Avaliação de macrófagos M1 (CD68+) e M2 (CD206+) em área peri-lesão de infarto por meio da técnica de imuno-histoquímica**

Após fixação, o tecido cardíaco foi incluído em parafina e cortes com espessura de 4  $\mu\text{m}$  foram fixados às lâminas de vidro. Para desparafinação, as lâminas foram mantidas por 30 minutos em estufa à 60°C e submetidas a uma bateria constituída por: 3 banhos em xilol absoluto por 9 minutos cada; 2 banhos em álcool absoluto por 5 minutos cada; e 2 banhos em álcool 96% por 3 minutos cada. Após a remoção do álcool através de um banho em água destilada por 5 minutos, as lâminas foram submetidas à recuperação antigênica por meio de vapor a 95° Celsius por 30 minutos em tampão alcalino EDTA.

A seguir, os cortes foram mergulhados em uma solução de bloqueio de peroxidase endógena, composto por metanol e peróxido de hidrogênio (concentração final de 3%), por 30 minutos, e após lavagem em PBS, foram submetidas a bloqueio com leite mólico 6% (Nestlé Brasil LTDA, São Paulo, Brasil) e albumina bovina 0,5% (Sigma-Aldrich, San Louis, EUA) em TBS. Os seguintes anticorpos foram utilizados como primários: anti-CD68 (ab31630, ABCAM, Califórnia, EUA) e anti-CD206 (ab64693, ABCAM, Califórnia, EUA), nas diluições 1:100 e 1:800, respectivamente. Após incubação com o anticorpo primário durante a noite a 4° Celsius, as lâminas foram incubadas com reagentes do kit Env Flex+, high pH (link) (K800221-2, Dako Co, Dinamarca), sendo reveladas com o mesmo kit e contracoradas com hematoxilina. Como controle positivo para a padronização dos anticorpos primários, foi utilizado baço de rato. O controle negativo do método foi realizado com a omissão do anticorpo primário.

A análise quantitativa das células CD68+ e CD206+ foi realizada sob microscopia óptica. Imagens em 400X de aumento microscópico foram capturadas da região peri-lesão, sendo considerada uma média de 7 campos, dependendo da dimensão da lesão. O foco da lesão foi identificado pela presença de necrose. Todos os campos eram obrigatoriamente preenchidos por infiltrados inflamatórios. As células em coradas em marrom foram contadas e os resultados foram expressos em células positivas por campo.

#### 4.15. Marcadores sistêmicos de estresse oxidativo

Por meio da análise do plasma dos animais, quantificou-se o estresse oxidativo sistêmico. Foram utilizadas técnicas que se baseiam na avaliação de metabolização de óxido nítrico (concentração de nitritos) na avaliação de promotores de dano (produção de espécies reativas de oxigênio – ânions superóxido e peróxido de hidrogênio), na avaliação de inibidores de dano (antioxidantes enzimáticos- superóxido dismutase), e na avaliação de produtos de oxidação de biomoléculas (lipoperoxidação - técnica TBARS-substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; e dano à proteína- técnica das carbonilas) (118).

##### Dosagem de Proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry et al., que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1mg/ml (119).

##### Dosagem do Peróxido de Hidrogênio

O peróxido de hidrogênio foi mensurado por meio da oxidação de vermelho de fenol mediada pela peroxidase rabanete (HRP), levando à formação de um composto mensurável de 610nm. O plasma foi incubado por 30 min a 37 °C em tampão fosfato 10 mmol/l (NaCl 140 mmol/l e dextrose 5 mmol/l). Os sobrenadantes foram transferidos para tubos com 0,28 mmol/l de vermelho de fenol e 8,5 U/ml de HRPO. Depois de 5 min de incubação, 1 mol/l de NaOH foi adicionado e os valores de absorbância da solução medidos a 610 nm. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (120).

##### Superóxido Dismutase (SOD)

A técnica utilizada foi baseada na inibição da reação do radical superóxido com o piragalol. Uma vez que não se consegue determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, se utiliza a quantificação em unidades relativas. Uma unidade de SOD foi definida como a

quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm durante 2 minutos. A atividade da SOD foi determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado. No meio de reação, foram utilizados 20  $\mu$ L de plasma 973  $\mu$ L de tampão Tris-Fosfato a 50 mmol/L (pH 8,2), 8  $\mu$ L de pirogalol a 24 mmol/L, 4  $\mu$ L de CAT a 30  $\mu$ mol/L. Esta curva obtida foi utilizada como branco. Foi também construída uma curva padrão utilizando três concentrações distintas de SOD (0,25U, 0,5U e 1U), a qual foi utilizada para obter-se a equação da reta para realização dos cálculos (121).

#### Medida de Lipoperoxidação (TBARS)

Para o ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, o ácido tricloroacético (20%, p/v), o SDS (8,1 %, p/v) e o ácido tiobarbitúrico (0,67%, p/v) foram adicionados ao plasma para precipitar as proteínas e para acidificar as amostras. Esta mistura foi, em seguida, centrifugada (4000 rpm, 5 min), e a amostra livre de proteína foi extraída. As amostras foram colocadas no banho (95°C) durante 30 min e ao término foram colocadas em gelo por 5 minutos. As absorbâncias foram medidas a 535nm. Os resultados foram expressos como micro moles por miligrama de proteína, adaptação de (122).

#### Capacidade antioxidante (FRAP)

O ensaio antioxidante de determinação do poder de redução do íon ferro, FRAP (do inglês Ferric Reducing Antioxidant Power), está baseado na produção do íon  $Fe^{2+}$  (forma ferrosa) a partir da redução do íon  $Fe^{3+}$  (forma férrica) presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ). Assim, a mudança na absorbância, é diretamente relacionada ao poder da redução total de doação de elétrons antioxidantes presentes na reação. Quando a redução ocorre, há uma alteração na tonalidade da mistura de reação, passando de roxo claro a um roxo intenso. Quanto maior a absorbância ou intensidade da coloração, maior será o potencial antioxidante total da amostra. A técnica foi realizada em microplaca, na qual adicionou-se a 290 $\mu$ L de reativo de FRAP (buffer acetato de sódio e ácido acético, pH 3,6; TPTZ 10mM; cloreto férrico hexahidratado 20mM) 10  $\mu$ l de uma solução-padrão de sulfato

ferroso heptahidratado ou 10 µL de amostra. A microplaca foi incubada durante 5 minutos com agitação à 37°C. A leitura foi realizada a 593nm.

#### Dosagem de Proteínas Oxidadas (Carbonilas)

O ensaio para detecção das carbonilas é uma das técnicas utilizadas para a determinação de proteínas modificadas oxidativamente (123). A técnica se baseia na reação das proteínas oxidadas do plasma sanguíneo com 2,4 dinitro fenil hidrazina (DNPH) em meio ácido, seguido de sucessivas lavagens com ácidos e solventes orgânicos e incubação final com guanidina. Desta forma, a absorbância das carbonilas foi medida em um espectrofotômetro a 360nm, num meio de reação contendo os seguintes reagentes-guanidina (6M) em ácido clorídrico (HCl) (2,5M) pH= 2,5; 2,4 DNPH em HCl (2,5M); ácido tricloroacético (TCA) 20%; TCA 10%; etanol - acetato de etila 1-1 (V/V). Paralelamente foi construída a curva padrão de proteína, com albumina, com a absorbância lida em 280nm no espectrofotômetro.

#### Dosagem do Ânion Superóxido

O ânion superóxido foi determinado nos homogenizados pela taxa de oxidação da adrenalina lido em espectrofotômetro a 480 nm.

#### **4.16. Coleta de tecidos e eutanásia do animal**

No quarto dia após o infarto, antes da eutanásia, foram coletadas amostras de sangue pela cânula femoral. O sangue, então, foi centrifugado por 15 min a 4.000 RPM, separando o plasma que foi imediatamente armazenado em freezer -80 °C para posterior análise dos parâmetros de estresse oxidativo. Após a coleta do sangue, os animais foram eutanasiados por meio de dose letal de anestésico e, a seguir, submetidos à perfusão do coração para posterior análise de imuno-histoquímica. Utilizou-se clorpromazina (medicação pré-anestésica) na dose de 50 mg/kg (intramuscular), e em seguida administrou-se pentobarbital na dose de 50 a 80 mg/K. O monitoramento constante do

animal até a ausência de reflexos óculo-palpebrais e sensitivos foi realizado para garantir a total anestesia dos animais, logo então foi realizada incisão abdominal transversal, para exposição dos órgãos e seção do átrio direito e canulação do ápice do ventrículo esquerdo para perfusão do animal. O coração foi parado em diástole pelo uso de solução com cloreto de potássio (14 mmol em solução fisiológica) e perfundido com pressão constante de 80-90 mmHg por um período de 10 a 15 minutos. Após este período, o coração foi perfundido com formol 4% tamponado por mais 10 a 15 minutos. Os tecidos foram deixados de 24 a 48 horas fixando em formol (4% tamponado) e posteriormente mantidos em álcool 70%.

Após os procedimentos, os animais foram armazenados em sacos leitosos com identificação e refrigerados e, posteriormente foram encaminhados à incineração por meio da concessionária especializada Loga.

#### **4.17 Análise estatística**

Para as análises das medidas descritivas e testes estatísticos, foi utilizado o programa Stata versão 15.1. Após a realização do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, os dados foram dispostos e apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média ou mediana  $\pm$  percentil 25. As comparações entre grupos foram feitas por meio da análise de variância (ANOVA) seguida de *Bonferroni post hoc test*, teste *t* de *Student* ou teste de Kruskal-Wallis. O valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado significativo.

## **5. RESULTADOS**

---

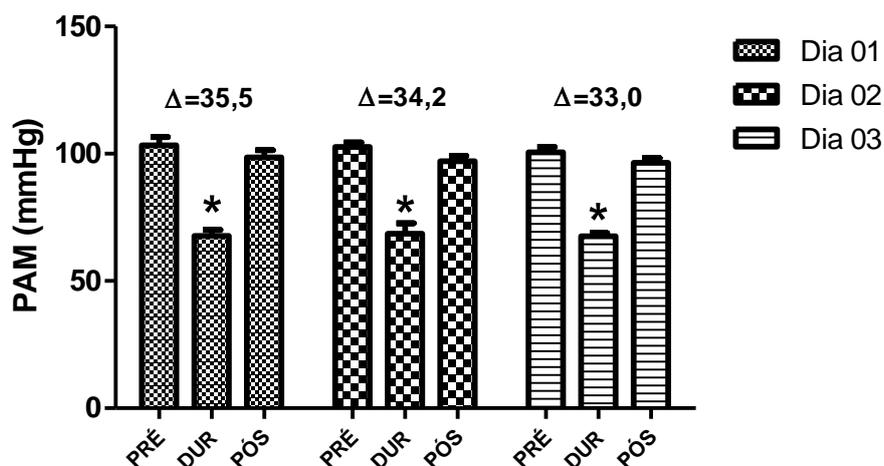
A apresentação dos resultados foi organizada em dois capítulos distintos: o capítulo 1 refere-se aos resultados do protocolo experimental e o capítulo 2 refere-se à revisão sistemática sobre a estimulação elétrica dos barorreceptores.

## **5.1 Parte I - Resultados referentes ao protocolo experimental**

A amostra total foi constituída por 25 ratos machos da linhagem *Wistar*, divididos em três grupos: grupo SHAM (n=5); grupo IAM (n=10) e grupo IAM+EST (n=10). O peso médio final foi semelhante entre os grupos (SHAM =  $318,5 \pm 6,7$ ; IAM =  $310,7 \pm 11,3$  e IAM+EST =  $312,5 \pm 9,2$ ).

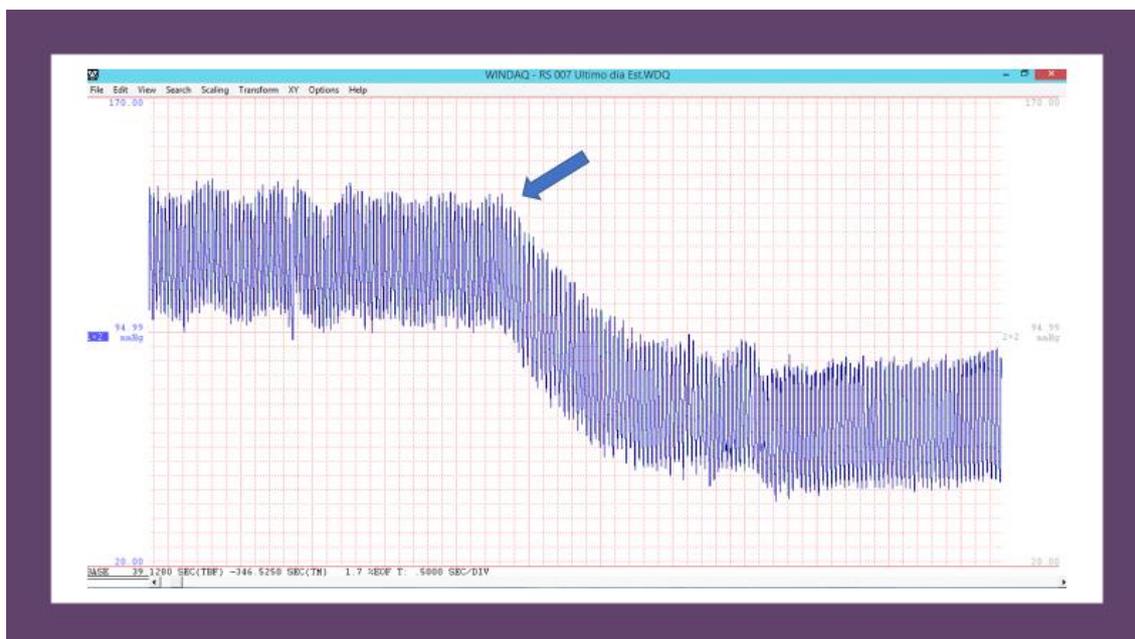
### **5.1.1 Estimulação elétrica do NDA no rato acordado**

O primeiro objetivo específico do estudo foi realizar cinco sessões de trinta minutos de estimulação do NDA entre os dias 1 e 3 pós IAM com o rato acordado, estimulação essa capaz de diminuir a pressão arterial média do rato em pelo menos 20 mmHg durante os trinta minutos da sessão. A Figura 13 apresenta os valores da PAM durante os três dias de estimulação de uma amostra de dez sessões cada dia. Observa-se que a corrente elétrica aplicada ( $T=0,2$  ms,  $F=20$  Hz e  $I=0,8$  mA) foi capaz de reduzir a PAM durante o período da estimulação em mais de 30 mmHg e que não houve diferença de resposta quando comparados os três dias de sessões.



**Figura 13** – Comportamento da Pressão Arterial Média nos três dias de estimulação. Valores correspondem à média e desvio padrão de 5 min de registro da PAM nos períodos PRÉ, DURANTE e PÓS estimulação;  $\Delta$  = variação da média da PAM durante a estimulação quando comparada com o período PRÉ estimulação;  $*=p \leq 0,05$  quando comparado o período durante a estimulação com os períodos PRÉ e PÓS estimulação (ANOVA *two way*, Bonferroni *post hoc test*).

A Figura 14 mostra um exemplo do registro da PA de uma sessão de estimulação no terceiro dia. Observa-se nítida queda da PA quando a estimulação começa (seta).



**Figura 14** – Registros da PA no início de uma sessão de estimulação no terceiro dia pós IAM.

### 5.1.2 Valores hemodinâmicos, variabilidade do intervalo de pulso e variabilidade da pressão arterial

Os valores hemodinâmicos para cada grupo experimental estão descritos em média e erro padrão da média na Tabela 1. Observa-se que os valores de pressão arterial (PAS, PAD e PAM) foram significativamente menores nos grupos infartados quando comparados com o grupo controle (SHAM). A PAD foi significativamente menor no grupo infartado e estimulado (IAM+EST) quando comparada com a PAD do grupo infartado não estimulado (IAM). Em relação à FC, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais.

**Tabela 1** – Parâmetros hemodinâmicos coletados no dia 04 pós IAM nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST

Parâmetros Hemodinâmicos	SHAM (n=5)	IAM (n=10)	IAM+EST (n=10)
PAS (mmHg)	135,66 ± 3,42	117,75 ± 3,01 *	117,54 ± 1,22 *
PAD (mmHg)	94,31 ± 2,67	83,68 ± 1,78*	77,02 ± 1,59 * <sup>‡</sup>
PAM (mmHg)	108,09 ± 2,75	95,04 ± 1,93*	90,53 ± 1,30*
FC (BPM)	347,34 ± 8,00	381,05 ± 16,26	361,22 ± 15,52

PAS = Pressão Arterial Sistólica; PAD = Pressão Arterial Diastólica; PAM = Pressão Arterial Média; FC = Frequência Cardíaca. Valores apresentados em média ± erro padrão da média. Anova *one way* seguida de Bonferroni *post hoc test*. \*= $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo SHAM. <sup>‡</sup>= $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo IAM.

A tabela 2 apresenta os dados de variabilidade do intervalo de pulso e da variabilidade da pressão arterial nos três grupos experimentais. Os valores estão descritos em média e erro padrão da média. O grupo IAM apresentou menor ITR em relação ao grupo SHAM. O ITR do grupo IAM+EST não foi diferente do ITR do grupo SHAM, mas foi significativamente maior que o ITR do grupo IAM. Em relação ao IBR, o grupo IAM+EST apresentou uma maior redução da FC por aumento idêntico da PA quando comparado aos grupos SHAM e IAM (Figura 15). O grupo IAM+EST apresentou uma melhor sensibilidade barorreflexa espontânea em relação ao grupo IAM (ALFA LF significativamente maior no grupo IAM+EST quando comparado com o ALFA LF do grupo IAM) (Figura 16).

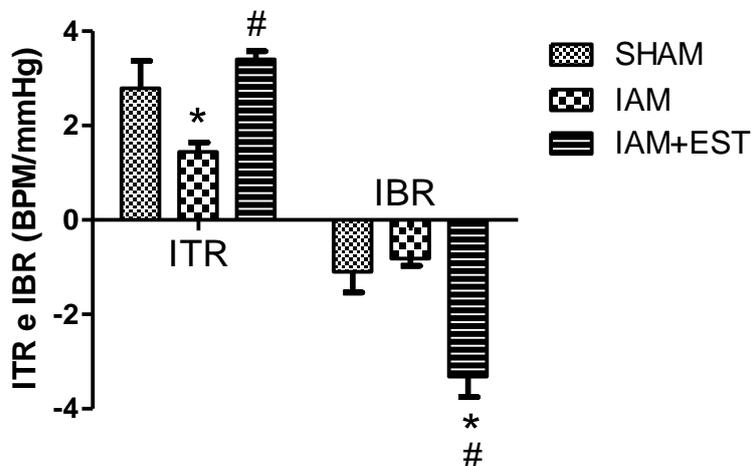
O valor de baixa frequência (LF nu) apresentou-se aumentado no grupo IAM quando comparado com os demais grupos, indicando uma maior modulação simpática. Da mesma forma, observou-se que o indicador de modulação da atividade parassimpática, alta frequência (HF nu), apresentou-se aumentado nos grupos SHAM e IAM+EST. A relação LF/HF, que reflete o equilíbrio simpato-vagal global, apresenta-se elevada no grupo IAM quando comparada aos grupos SHAM e IAM+EST (Figura 17). Dessa forma, foi possível observar que os parâmetros HF e LF, importantes indicadores da função autonômica, foram semelhantes entre os grupos SHAM e IAM+EST, demonstrando efeito benéfico da estimulação elétrica do NDA na manutenção da modulação autonômica (Tabela 2).

Nos demais parâmetros de VIP e de VPA estudados não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes.

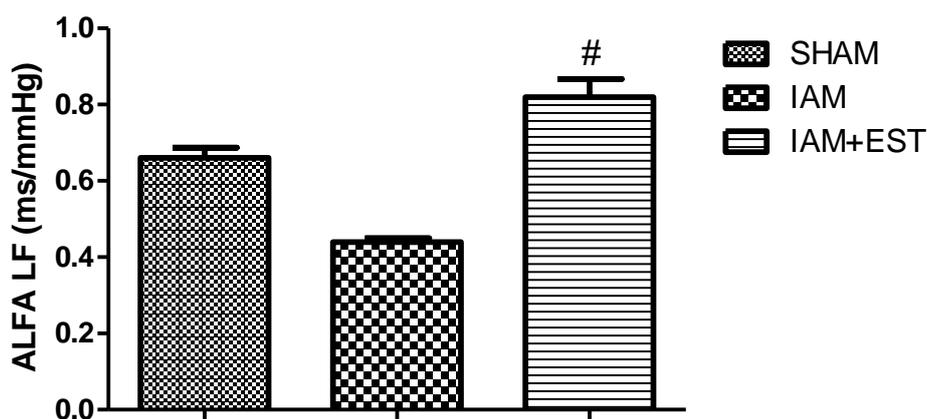
**Tabela 2** – Parâmetros de VIP e de VPA coletados no dia 04 pós IAM nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST

<b>Parâmetros VFC e VPA</b>	<b>SHAM (n=5)</b>	<b>IAM (n=10)</b>	<b>IAM+EST (n=10)</b>
<b>SD RR (ms)</b>	6,04 ± 1,04	4,60 ± 0,30	6,12 ± 0,70
<b>RMSSD (ms)</b>	4,81 ± 0,89	3,59 ± 0,13	5,38 ± 0,84
<b>SD PAS (mmHg)</b>	4,22 ± 1,06	3,44 ± 0,20	4,12 ± 0,31
<b>ITR(BPM/mmHg)</b>	2,79 ± 0,58	1,44 ± 0,20 *	3,40 ± 0,18 <sup>¥</sup>
<b>IBR (BPM/mmHg)</b>	-1,10 ± 0,43	-0,82 ± 0,15	-3,32 ± 0,43 * <sup>¥</sup>
<b>VAR RR (ms<sup>2</sup>)</b>	32,69 ± 4,61	23,16 ± 2,70	41,44 ± 8,18
<b>LF nu</b>	15,57 ± 1,11	25,84 ± 3,11 *	14,06 ± 1,65 <sup>¥</sup>
<b>HF nu</b>	84,43 ± 1,11	74,16 ± 3,11 *	85,94 ± 1,65 <sup>¥</sup>
<b>VAR PAS (mmHg<sup>2</sup>)</b>	20,02 ± 9,66	11,27 ± 1,43	20,96 ± 2,41
<b>LF PA (mmHg<sup>2</sup>)</b>	4,74 ± 1,78	2,59 ± 0,36	3,57 ± 0,45
<b>LF/HF</b>	0,18 ± 0,015	0,36 ± 0,066*	0,16 ± 0,022 <sup>¥</sup>
<b>ALFA LF (ms/mmHg)</b>	0,66 ± 0,06	0,44 ± 0,03	0,82 ± 0,15 <sup>¥</sup>

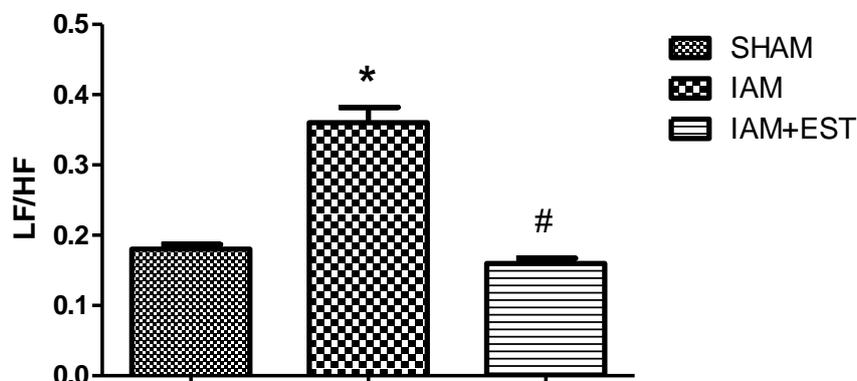
Valores apresentados em média ± erro padrão da média. Anova *one way* seguida de Bonferroni *post hoc test*. \*= $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo SHAM. <sup>¥</sup>= $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo IAM.



**Figura 15** – ITR e IBR coletados no dia 04 pós IAM nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST. Valores apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. Anova *one way* seguida de Bonferroni *post hoc test*.  $*=p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo SHAM.  $\#=p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo IAM. IBR=Índice de Bradicardia Reflexa; ITR=Índice de Taquicardia Reflexa



**Figura 16** – Sensibilidade barorreflexa espontânea (Alfa LF) no dia 04 pós IAM nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST. Valores apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. Anova *one way* seguida de Bonferroni *post hoc test*.  $*=p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo SHAM.  $\#=p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo IAM. LF=Low Frequency



**Figura 17** – Balanço simpático-vagal global (LF/HF) no dia 04 pós IAM nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST. Valores apresentados em média ± erro padrão da média. Anova *one way* seguida de Bonferroni *post hoc test*. \*=p≤0,05 quando comparado com o grupo SHAM. #=p≤0,05 quando comparado com o grupo IAM. LF=Low Frequency; HF=High Frequency.

### 5.1.3 Parâmetros ecocardiográficos

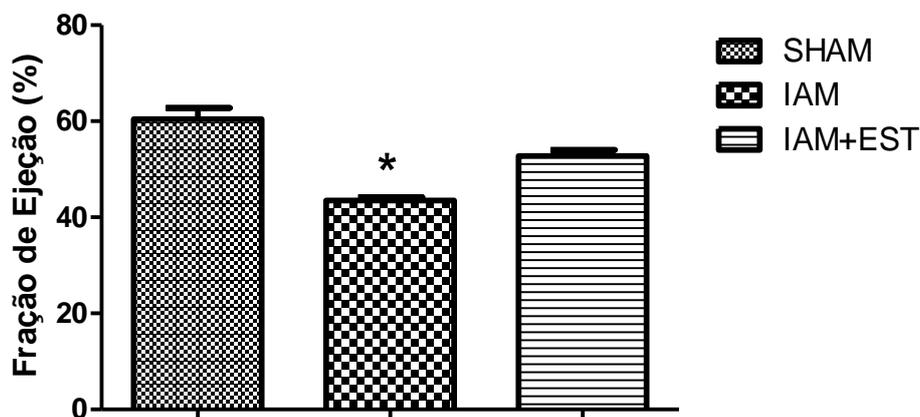
A Tabela 3 apresenta os parâmetros ecocardiográficos que avaliam a função sistólica e diastólica do VE bem como alguns parâmetros morfométricos no dia 03 pós IAM. Os dados estão dispostos em média e erro padrão da média. Verifica-se que os grupos infartados IAM e IAM+EST apresentaram um maior tempo de relaxamento isovolumétrico quando comparados com o grupo SHAM. Esse índice aumentado está relacionado à disfunção diastólica cardíaca. No que se refere à função sistólica do ventrículo esquerdo, a FE é um parâmetro clinicamente importante e com grande poder de predição de desfecho pós IAM. Como esperado, o grupo IAM apresentou uma FE menor quando comparado com o grupo SHAM. No grupo infartado que recebeu o tratamento com a estimulação elétrica do NDA (IAM+EST), a FE não diminuiu da mesma forma como no grupo infartado que não recebeu o tratamento (IAM). O grupo IAM+EST apresentou um valor de FE semelhante ao valor de FE do grupo SHAM (Figura 18). No mesmo sentido, o aumento do diâmetro sistólico final no grupo IAM, quando comparado com o grupo SHAM, foi atenuado pelo tratamento no grupo IAM+EST. A área de infarto

medida por meio da ecocardiografia mostrou-se semelhante nos dois grupos infartados, ambos diferindo do grupo SHAM (Figura 19). Avaliando a relação E/E', um marcador não invasivo da elevação das pressões de enchimento do VE, verificou-se que o grupo IAM apresentou um valor dessa relação significativamente maior quando comparado com o grupo SHAM. Apesar do grupo IAM+EST apresentar um valor de relação E/E' média maior que o grupo SHAM e menor que o grupo IAM, não houve diferença estatisticamente significativa nesse parâmetro do grupo IAM+EST quando comparado com os grupos SHAM e IAM (Figura 20). Não foi encontrada diferença estatística significativa nos demais parâmetros ecocardiográficos estudados.

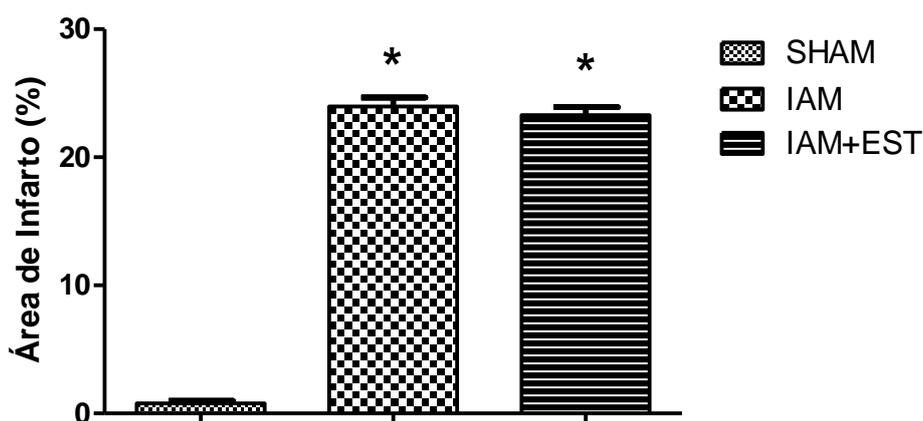
**Tabela 3** – Parâmetros ecocardiográficos coletados no dia 03 pós IAM nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST

<b>Parâmetros Ecocardiográficos</b>	<b>SHAM (n=5)</b>	<b>IAM (n=10)</b>	<b>IAM+EST (n=10)</b>
<b>ADFVE (cm<sup>2</sup>)</b>	0,435 ± 0,0324	0,411 ± 0,0335	0,450 ± 0,0435
<b>CDVE (cm)</b>	2,388 ± 0,0955	2,321 ± 0,0978	2,398 ± 0,0972
<b>ASFVE (cm<sup>2</sup>)</b>	0,172 ± 0,0278	0,232 ± 0,0217	0,230 ± 0,0342
<b>CSVE (cm)</b>	1,500 ± 0,1210	1,744 ± 0,0792	1,740 ± 0,1147
<b>Septo D (cm)</b>	0,161 ± 0,0103	0,157 ± 0,0573	0,116 ± 0,0085
<b>DDVE (cm)</b>	0,711 ± 0,0157	0,748 ± 0,0455	0,751 ± 0,0258
<b>PPD (cm)</b>	0,160 ± 0,0087	0,165 ± 0,0115	0,176 ± 0,0128
<b>DSVE (cm)</b>	0,364 ± 0,0202	0,553 ± 0,0363*	0,504 ± 0,0359
<b>Onda E (cm/s)</b>	79,46 ± 4,9793	83,08 ± 6,2740	99,04 ± 11,0480
<b>Onda A (cm/s)</b>	47,98 ± 7,2823	44,64 ± 6,2194	55 ± 7,2128
<b>REL E/A</b>	1,741 ± 0,1564	2,115 ± 0,2783	1,879 ± 0,1360
<b>TRIV</b>	0,020 ± 0,0009	0,026 ± 0,0012*	0,027 ± 0,015*
<b>Onda S' (cm/s)</b>	3,688 ± 0,1269	2,979 ± 0,3026	3,218 ± 0,2453
<b>Onda E' (cm/s)</b>	5,426 ± 0,6907	5,314 ± 0,8617	5,048 ± 0,837
<b>Onda A' (cm/s)</b>	4,774 ± 0,8567	4,844 ± 0,5861	5,088 ± 1,032
<b>E/E'</b>	11,20 ± 0,59	24,24 ± 3,64*	19,40 ± 2,96
<b>RR (s)</b>	0,167 ± 0,0099	0,159 ± 0,0070	0,155 ± 0,009
<b>Área Infarto (%)</b>	0,78 ± 0,48	23,97 ± 2,09*	23,28 ± 1,87*
<b>FE (%)</b>	60,466 ± 5,2199	43,490 ± 2,0368*	52,775 ± 3,824

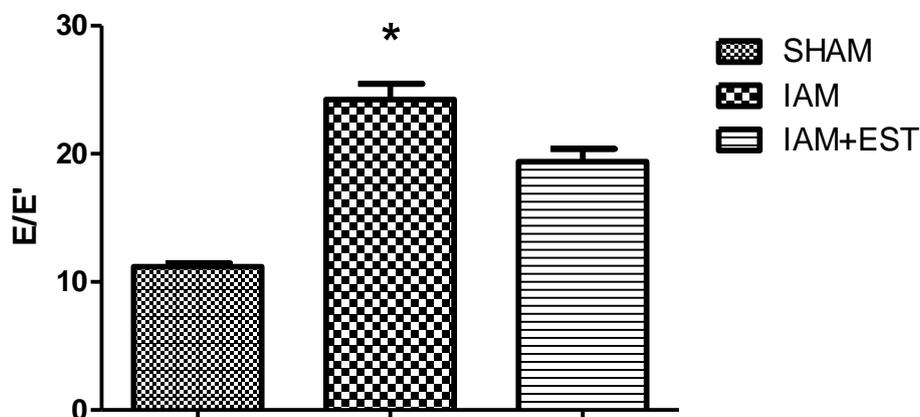
Valores apresentados em média ± erro padrão da média. Anova *one way* seguida de Bonferroni *post hoc test*. \*= $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo SHAM.



**Figura 18** – Fração de ejeção do VE medida por meio da ecocardiografia no dia 04 pós IAM. Valores expressos em média e erro padrão da média da % do volume diastólico final que foi ejetado. Anova *one way* seguida de Bonferroni *post hoc test*.  $*=p\leq 0,05$  quando comparado com o grupo SHAM.



**Figura 19** – Área de infarto medida por meio da ecocardiografia no dia 04 pós IAM. Valores expressos em média e erro padrão da média da % do VE infartado. Anova *one way* seguida de Bonferroni *post hoc test*.  $*=p\leq 0,05$  quando comparado com o grupo SHAM.



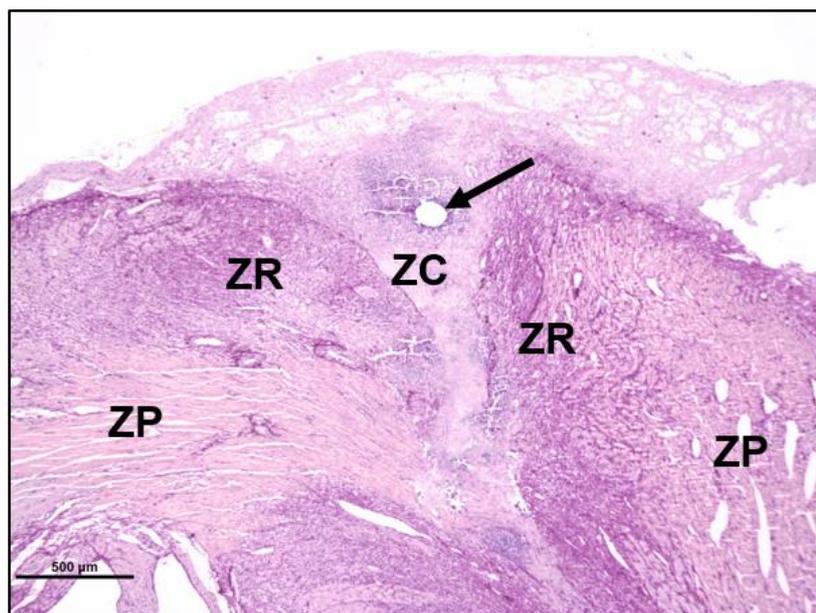
**Figura 20** – Relação E/E' medida por meio da ecocardiografia no dia 04 pós IAM. Valores expressos em média e erro padrão da média da % do VE infartado. Anova *one way* seguida de Bonferroni *post hoc test*. \*= $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo SHAM. E/E' = marcador não invasivo da elevação das pressões de enchimento do VE.

#### 5.1.4 Avaliação histopatológica da lesão

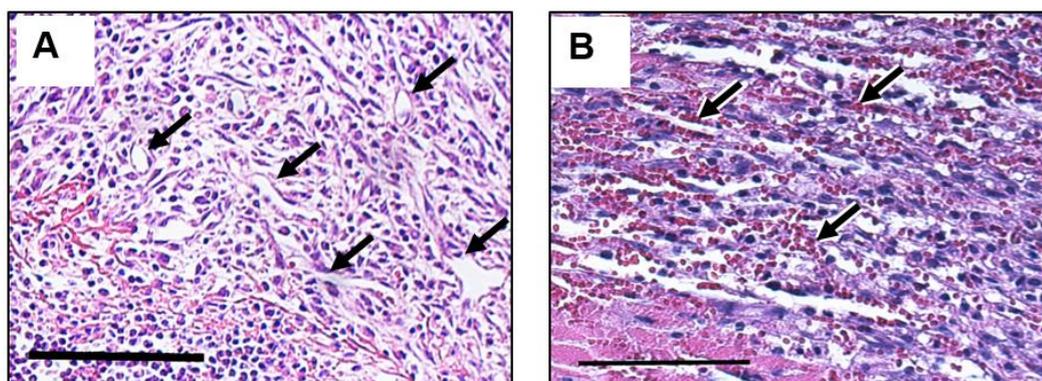
A reação tecidual à lesão seguiu um padrão estrutural semelhante, tanto naqueles animais estimulados como nos animais não estimulados, ou seja, o tecido inflamatório se infiltrou na lesão e houve a promoção das etapas clássicas do reparo tecidual do tipo inflamatório dos tecidos que não apresentam regeneração.

De forma geral, foram identificadas, na região do infarto, as três zonas resultantes da reação à injúria do tecido muscular estriado: zona central (ZC), a zona de reparo (ZR) e a zona das células musculares preservadas (ZP), como mostra a Figura 21.

A presença de neovascularização (típica do tecido de granulação) pode ser observada na zona de reparo da lesão nos dois grupos. No entanto, no grupo IAM+EST os neovasos já estão repletos de hemácias, configurando a presença de circulação sanguínea, enquanto que, no grupo infartado não estimulado, o processo de neovascularização se encontra ainda em fase inicial (Figura 22).



**Figura 21** - Fotomicrografia de um corte histológico (corado com HE) obtido da área do infarto. Esta imagem foi escolhida para ilustrar o aspecto histológico do reparo. Observa-se toda a extensão da lesão em corte transversal. Notam-se as três regiões características do processo de reparo muscular: a zona central (ZC) representada pelo depósito de fibrina e células inflamatórias; a zona de reparo (ZR) caracterizada pela grande quantidade de células inflamatórias, e a zona preservada (ZP), mais periférica, com cardiomiócitos íntegros. Notar o orifício deixado pelo fio de sutura (seta) na zona central.



**Figura 22** - Fotomicrografias representativas da zona de reparo dos corações dos animais do Grupo IAM (A) e IAM EST (B). Nota-se a ausência de hemácias na luz dos neocapilares (setas) no Grupo IAM, enquanto que no Grupo IAM EST observa-se a grande quantidade de hemácias (que aparecem como corpúsculos fortemente eosinófilos) preenchendo a luz dos neovasos (setas), o que corresponde à tradução morfológica do reestabelecimento da circulação local na zona de reparo do coração dos animais estimulados. Coloração HE; Barras = 100μm.

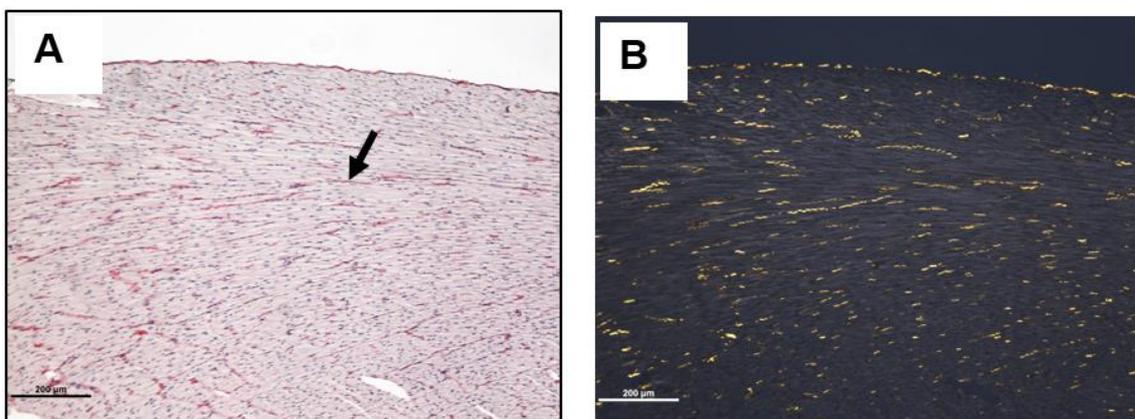
### **Avaliação da organização e distribuição das fibras de colágeno**

As lâminas coradas pelo Picrossírius-hematoxilina foram examinadas sob luz convencional e sob luz polarizada para identificação do grau de agregação e disposição das fibras colagênicas.

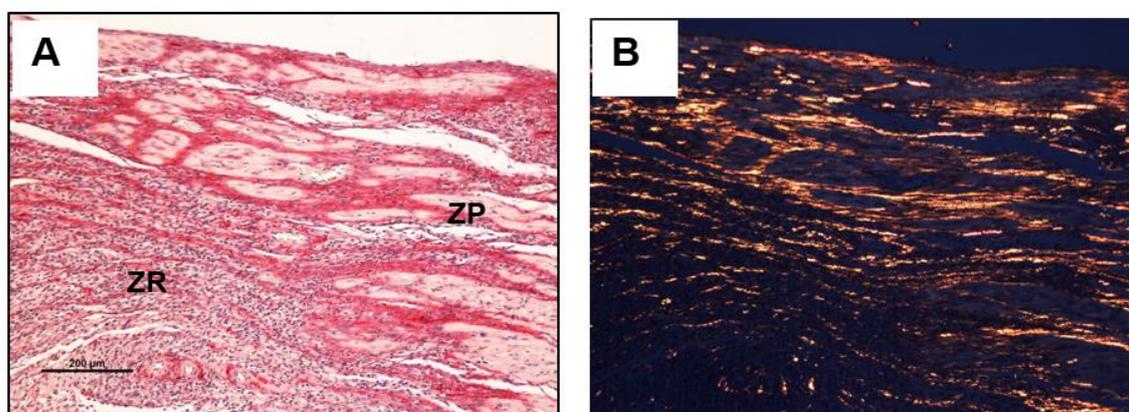
A análise dos corações do grupo SHAM, corados com Picrossírius hematoxilina, mostra finas fibras de colágeno dispostas paralelamente ao maior eixo dos cardiomiócitos. Além disso, há um delgado estrato de fibras de colágeno no epicárdio e no endocárdio. Quando estes mesmos preparados foram examinados sob luz polarizada, pode-se evidenciar as fibras de colágeno finas, fracamente birrefringentes amareladas (Figura 23), formando um arcabouço delicado de sustentação e transmissão das forças contráteis.

Quando se examinaram os cortes histológicos de coração dos animais do Grupo IAM não foram observadas fibras colagênicas na zona central. Já na zona de reparo, estas fibras apareceram espessas, ocupando também parte da zona preservada adjacente à lesão. Sob luz polarizada, mostraram-se como fibras grossas, fortemente birrefringentes avermelhadas, características dos tecidos cicatriciais (Figura 24).

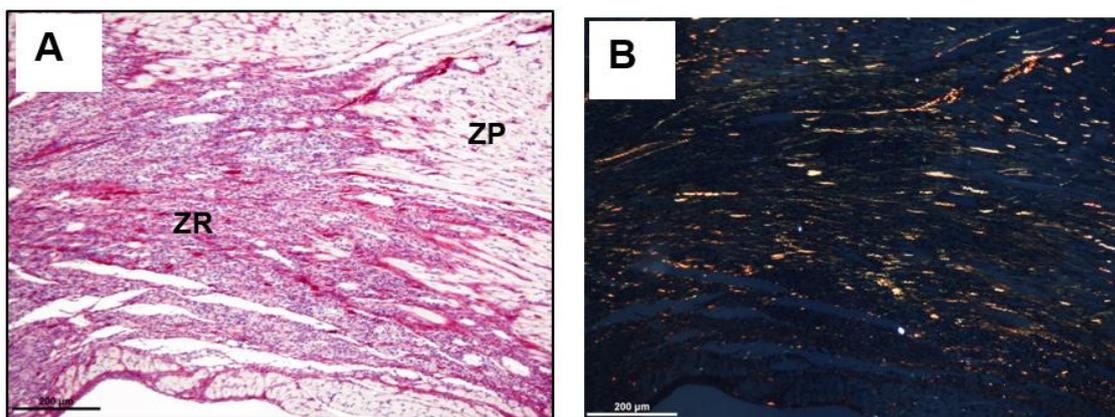
Por sua vez, a análise da distribuição do colágeno nos corações obtidos do Grupo IAM+EST mostrou também ausência de fibras na zona central. Porém, tanto na zona de reparo com na zona preservada adjacente à lesão, o colágeno se depositou sob a forma de fibras finas dispostas paralelamente entre si, diferindo daquele aspecto fibrótico encontrado no Grupo IAM (Figura 25).



**Figura 23** - Corte histológico de coração de animal SHAM, corado com Picrossírius-hematoxilina. Em (A), observação com luz convencional e em (B) com luz polarizada. Em (A), veem-se fibras de colágeno, coradas em vermelho (seta), dispostas paralelamente aos cardiomiócitos. Em (B), estas mesmas fibras mostram-se finas e de fraca birrefringência.



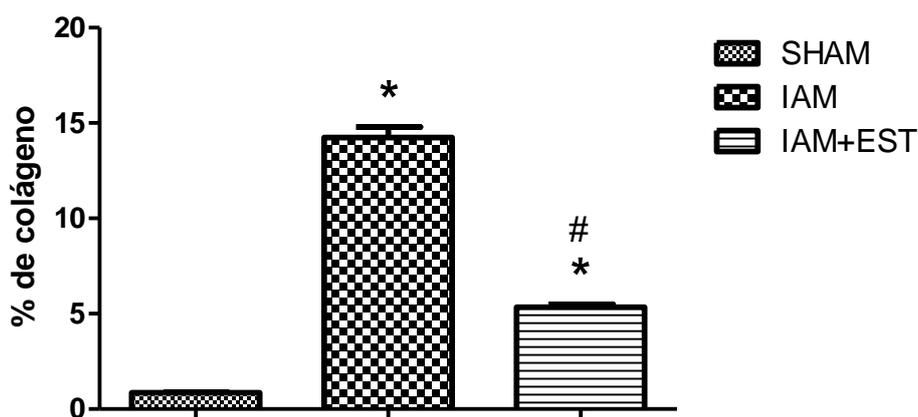
**Figura 24** - Corte histológico de coração de animal do grupo IAM, corado com Picrossírius-hematoxilina. Em (A), sob luz convencional, veem-se muitas fibras colágenas na zona de reparo (ZR) e na zona preservada (ZP) adjacente. Em (B), o mesmo corte sob luz polarizada, mostra que estas fibras são grossas, com forte birrefringência de cor avermelhada e estão dispostas paralelamente entre si com o aspecto das *fibras colágenas* típicas dos tecidos fibróticos cicatriciais.



**Figura 25** - Corte histológico de coração de animal do grupo IAM+EST, corado com Picrosúrius-hematoxilina. Em (A), sob luz convencional, nota-se a presença de poucas fibras colagênicas tanto na zona de reparo (ZR) como na zona preservada (ZP). Em (B), o mesmo corte sob luz polarizada, mostra que, embora em maior quantidade, as fibras de colágeno têm um aspecto estrutural que se assemelha mais ao colágeno do coração do grupo SHAM.

#### Análise quantitativa das fibras de colágeno

A figura 26 apresenta o percentual de colágeno por campo da lesão. O grupo IAM apresentou um valor percentual de colágeno maior que o grupo SHAM e IAM+EST. Verifica-se que a estimulação foi capaz de reduzir significativamente a deposição de colágeno na lesão avaliada no quarto dia pós IAM.



**Figura 26** – Percentual de colágeno na lesão nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST. Valores apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. Anova *one way* seguida de Bonferroni *post hoc* test.  $*=p\leq 0,05$  quando comparado com o grupo SHAM.  $\#=p\leq 0,05$  quando comparado com o grupo IAM.

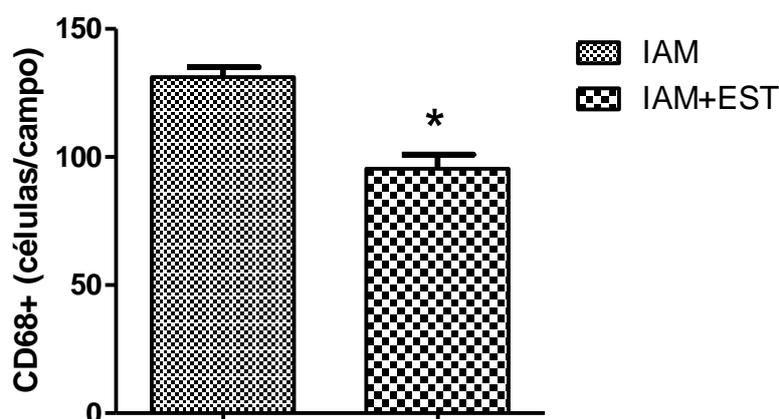
### 5.1.5 Avaliação da proporção de Macrófagos M1(CD68+) e macrófagos M2(CD206+) na região peri-lesão do IAM por imuno-histoquímica

A análise quantitativa das células CD68+ e CD206+ foi realizada sob microscopia óptica. Imagens em 400X de aumento microscópico foram capturadas da região peri-lesão, sendo considerada uma média de 7 campos. A tabela 4 apresenta a média e o erro padrão da média do número de células por campo na região peri-lesão nos grupos IAM e IAM+EST. Observa-se um menor número por campo de macrófagos M1 no grupo IAM+EST quando comparado com o grupo IAM (Figura 27 e 28). Quando avaliado o número de macrófagos M2 na região peri-lesão, verificou-se um maior número por campo dessas células no grupo IAM+EST quando comparado com o grupo IAM (Figura 29 e 30).

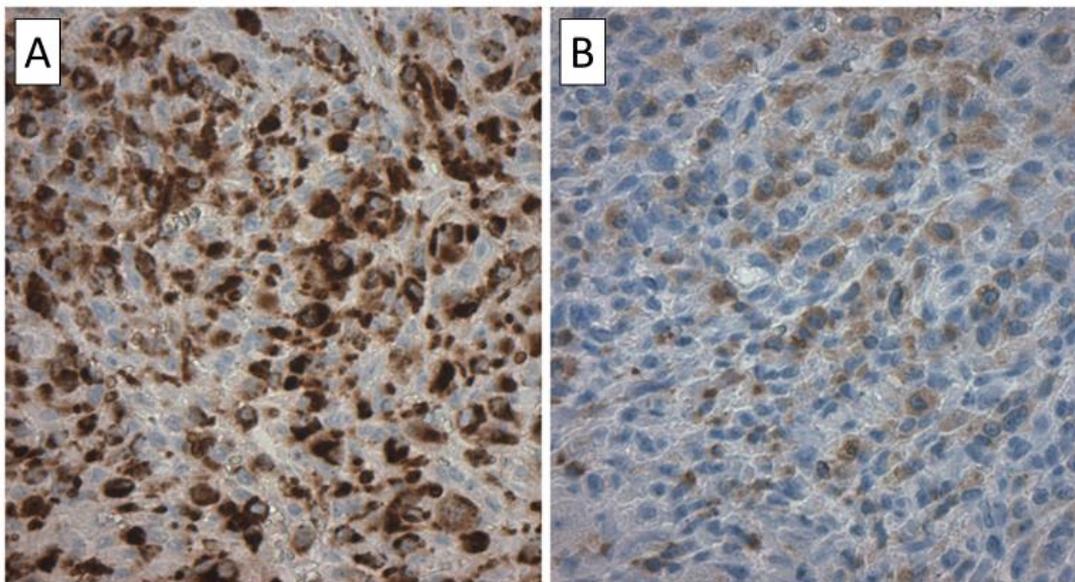
**Tabela 4** – Números de macrófagos por campo nos grupos IAM e IAM+EST

Macrófagos	IAM (n=09)	IAM+EST (n=09)
CD68+ (nº de células/campo)	131,13±11,75	95,46± 16,27*
CD206+ (nº de células/campo)	96,38± 22,35	143,69±15,23*

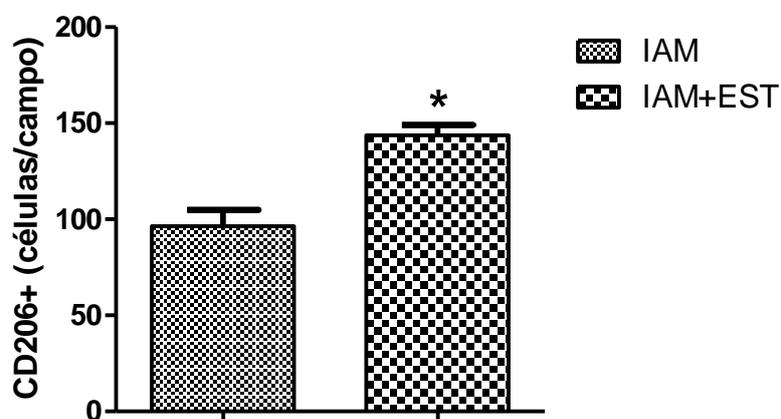
Valores apresentados em média ± erro padrão da média. Teste *t de student* para grupos independentes. \*=p≤0,05



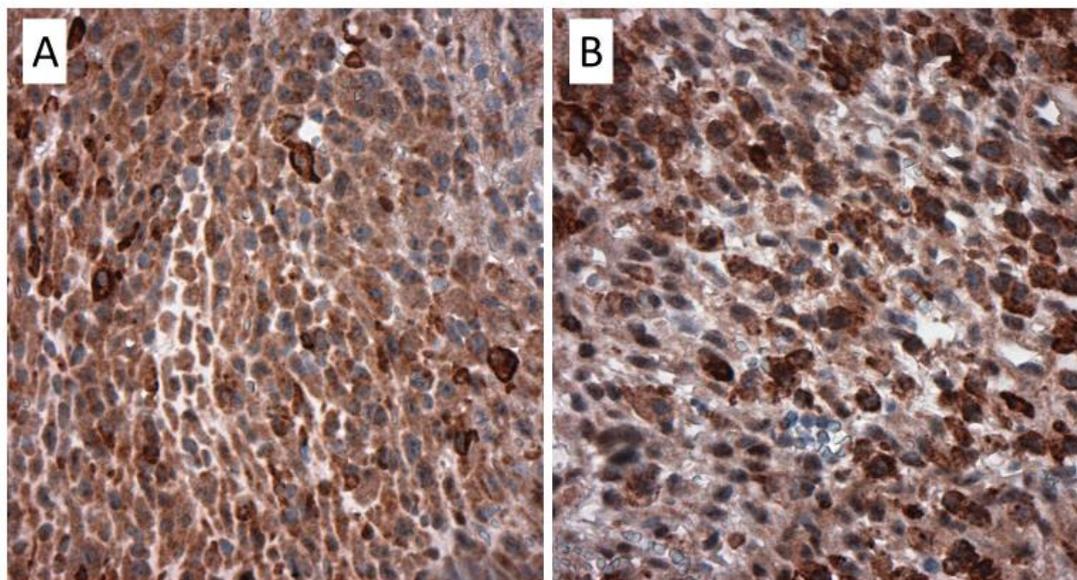
**Figura 27** – Número de macrófagos M1 por campo na região peri-lesão dos grupos IAM e IAM+EST. Valores apresentados em média ± erro padrão da média. Teste *t de student* para grupos independentes. \*=p≤0,05



**Figura 28** - Imuno-histoquímica para marcação de células CD68+, macrófagos M1. Padrão observado de distribuição de infiltrado de macrófagos M1 em tecido cardíaco infartado para os grupos IAM (A) e IAM+EST (B).



**Figura 29** – Número de macrófagos M2 por campo na região peri-lesão dos grupos IAM e IAM+EST. Valores apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. Teste *t de student* para grupos independentes.  $*=p\leq 0,05$



**Figura 30** - Imuno-histoquímica para marcação de células CD206+, macrófagos M2. Padrão observado de distribuição de infiltrado de macrófagos M2 em tecido cardíaco infartado para os grupos IAM (A) e IAM+EST (B).

### 5.1.6 Marcadores sistêmicos de estresse oxidativo

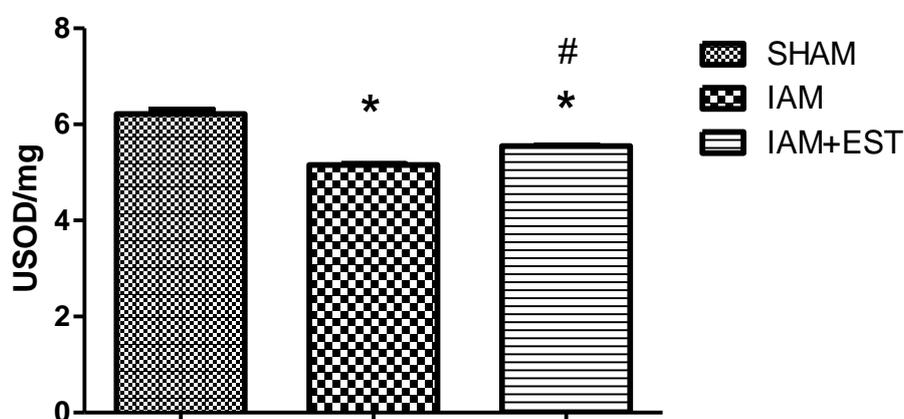
A tabela 5 mostra os parâmetros plasmáticos de estresse oxidativo. Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. Quando avaliada a atividade da superóxido dismutase (SOD) (importante antioxidante), observa-se que o grupo IAM apresenta uma redução na atividade dessa enzima quando comparado com o grupo SHAM. A estimulação do NDA melhorou essa atividade de maneira estatisticamente significativa no grupo IAM+EST em relação ao grupo IAM, mas não de maneira suficiente para tornar essa atividade semelhante à do grupo SHAM (Figura 31). Os grupos infartados (IAM e IAM+EST) apresentaram um maior valor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) quando comparados com o valor do grupo SHAM (Figura 32). Observa-se um aumento estatisticamente significativo no conteúdo de proteínas oxidadas (carbonilas) do grupo IAM quando comparado com o grupo SHAM. A estimulação elétrica do NDA diminuiu significativamente esse tipo de dano proteico (Figura 33). Avaliando-se a concentração de ânion superóxido, o grupo IAM apresentou uma maior concentração quando comparado ao grupo SHAM. O grupo IAM+EST apresentou uma

concentração de  $O_2^-$  semelhante a do grupo SHAM e significativamente menor que a do grupo IAM (Figura 34). Nos demais parâmetros de estresse oxidativo, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

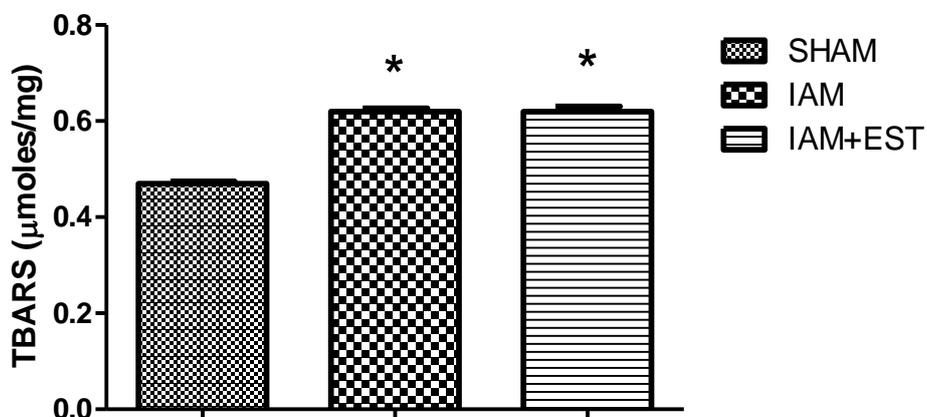
**Tabela 5** – Marcadores sistêmicos de estresse oxidativo nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST

Parâmetros de estresse oxidativo	SHAM (n=5)	IAM (n=10)	IAM+EST (n=10)
$H_2O_2$ ( $\mu M$ )	5,54 $\pm$ 0,47	6,16 $\pm$ 0,49	5,47 $\pm$ 1,17
SOD (USOD/mg)	6,22 $\pm$ 0,22	5,16 $\pm$ 0,06*	5,55 $\pm$ 0,04* <sup>‡</sup>
TBARS( $\mu$ moles/mg)	0,47 $\pm$ 0,01	0,62 $\pm$ 0,02*	0,62 $\pm$ 0,03*
FRAP (mM Fe (ii))	-	0,16 $\pm$ 0,04	0,16 $\pm$ 0,05
Carbonilas(nmol/mg)	1,66 $\pm$ 0,22	2,24 $\pm$ 0,09*	1,96 $\pm$ 0,07
$O_2^-$ (mmoles/mg)	1,23 $\pm$ 0,08	1,5 $\pm$ 0,03*	1,26 $\pm$ 0,05 <sup>‡</sup>

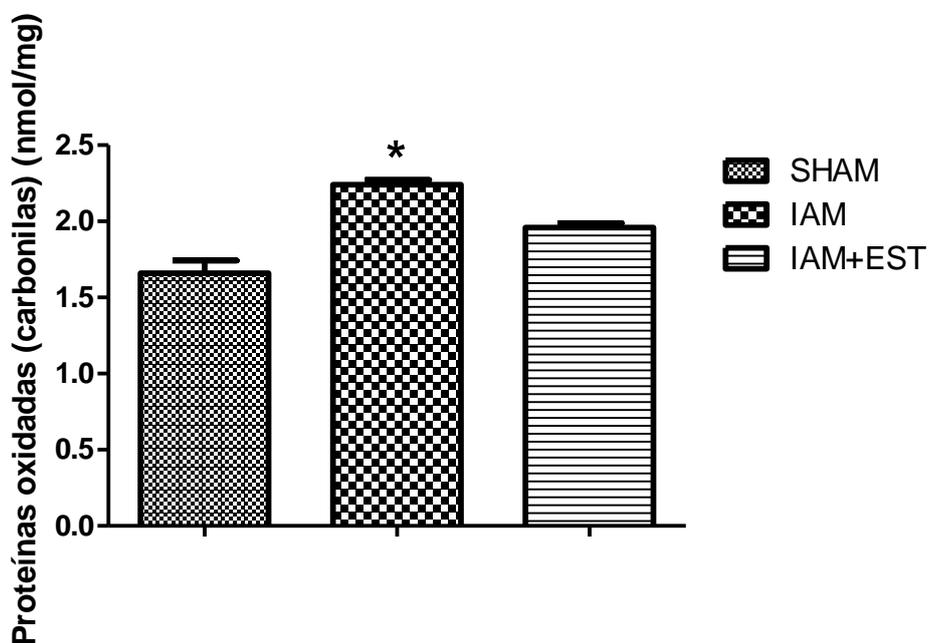
Valores apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. Anova *one way* seguida de Bonferroni *post hoc test*. \*= $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo SHAM. <sup>‡</sup>= $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo IAM.



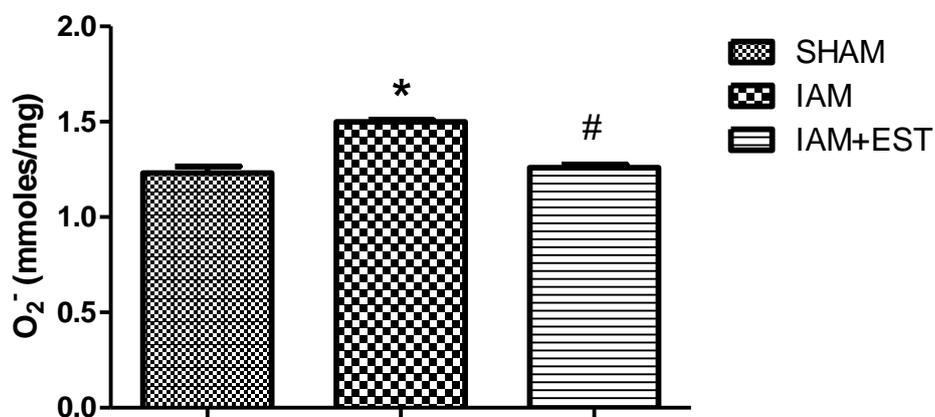
**Figura 31** – Atividade da SOD nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST. Valores apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. Anova *one way* seguida de Bonferroni *post hoc test*. \*= $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo SHAM. #= $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo IAM. SOD=Superóxido Dismutase.



**Figura 32** – TBARS nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST. Valores apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. Anova *one way* seguida de Bonferroni *post hoc test*.  $*=p\leq 0,05$  quando comparado com o grupo SHAM. TBARS= substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.



**Figura 33** – Conteúdo de proteínas oxidadas (carbonilas) nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST. Valores apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. Anova *one way* seguida de Bonferroni *post hoc test*.  $*=p\leq 0,05$  quando comparado com o grupo SHAM.



**Figura 34** – Concentração de ânion superóxido nos grupos SHAM, IAM e IAM+EST. Valores apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. Anova *one way* seguida de Bonferroni *post hoc test*.  $*=p\leq 0,05$  quando comparado com o grupo SHAM.  $\#=p\leq 0,05$  quando comparado com o grupo IAM.

**5.2 Parte II – Revisão sistemática (formatado conforme *European Journal of Heart Failure*)**

**Title: Safety and Efficacy of Baroreflex Activation Therapy for Heart Failure: A rapid systematic review**

**Authors:**

**Rodrigo Schmidt<sup>1,2,3</sup>; MSc.; Ph.D. candidate**

**Clarissa Garcia Rodrigues<sup>4</sup>; Ph.D.**

**Kelen Heinrich Schmidt<sup>5</sup>; Ph.D.**

**Maria Claudia Irigoyen<sup>1</sup>; Ph.D.;**

**Institution:**

**Heart Institute (InCor), Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil**

**Corresponding author:**

**Maria Claudia Costa Irigoyen**

**Cell Phone:**

**E-mail: [hipirigoyen@gmail.com](mailto:hipirigoyen@gmail.com)**

**Total words: 2819**

---

<sup>1</sup> Heart Institute (InCor), Medical School, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

<sup>2</sup> Institute of Neuro-Immune Medicine, Nova Southeastern University, Fort Lauderdale, United States of America.

<sup>3</sup> Miami Veterans Affairs Healthcare System, Miami, FL.

<sup>4</sup> Global Research and Innovation Network (GRINN), Joinville, Brazil.

<sup>5</sup> Institute of Neuro-Immune Medicine, Nova Southeastern University, Fort Lauderdale, United States of America. (W.O.C.).

**Abstract**

**Introduction:** Heart failure (HF) is associated with high mortality and morbidity rates despite the advances in medical therapies. Baroreflex activation therapy (BAT) seems to restore the sympathovagal balance responsible for the symptoms and progression of the disease.

**Objective:** To retrieve and assess the available data in the literature about the safety and efficacy of BAT in HF patients, through a rapid systematic review of clinical studies.

**Methods:** Rapid systematic review of literature. Searched electronic databases included: PubMed, EMBASE, CENTRAL, Scopus and Web of Science using Mesh and free terms for HF and BAT. No language restriction was used for the searches. We included full peer reviewed publications of clinical studies (randomized or not), including patients with HF undergoing BAT, with or without control group, assessing safety and efficacy outcomes. One reviewer conducted the analysis of the selected abstracts and the full-text articles, performed data extraction and evaluated the methodological quality of the selected articles. The methodological quality was assessed according to the Cochrane Collaboration instruments. A descriptive summary of the results is provided.

**Results:** Of the 441 citations screened, 10 publications were included (three were only conference abstracts), reporting data from three studies. Only one study was a RCT. The BAT procedure requires a learning curve; however, the procedure seems to be safe when performed by a well-trained multi professional team. An 86% rate of system and procedure-related complication-free was reported, with no cranial nerve injuries. Improvements in NYHA class of HF, quality of life, six-minute walk test, and hospitalization rates; as well as in MSNA. No meta-analysis was conducted due to the lack of homogeneity across studies.

**Conclusion:** BAT procedure seems to be safe if appropriate training is provided. Improvements in clinical outcomes were described in all included studies. However, several limitations do not allow us to make conclusive statements on the efficacy of BAT for HF. New well-designed trials are still needed.

**Key-words:** heart failure, baroreflex activation therapy, rapid review.

## **Introduction**

Mortality, morbidity and healthcare costs related to heart failure (HF) remains unacceptable high although the advances in the medical field (1,2). The symptoms and the progression of the disease is promoted by sympathovagal imbalance, including an excessive activation of the sympathetic and inhibition of the parasympathetic nervous system (3,4). In this context, baroreflex activation therapy (BAT), which is a treatment based on the stimulation of the baroreceptors located at the carotid sinus (5) and supposedly restores sympathovagal balance, has been reported in the literature (6,7).

Large animal studies demonstrated a survival benefit when compared to untreated controls, as well as improvements in cardiac function, susceptibility to ventricular arrhythmias (8–10). The first-in-human study (6), which was a single center, open label trial including 11 patients, was published in 2014. The study included patients with NYHA class III, ejection fraction lower than 40%, optimized medical therapy, and ineligible for cardiac resynchronization. The results showed that BAT was safe and provided chronic improvements in muscle sympathetic nerve activity (MSNA), quality of life and functional capacity (6).

In 2015, the first randomized clinical trial (RCT) was published in the literature including 76 patients underwent to BAT and 70 controls. Similarly, the study showed that BAT is safe and improves functional capacity, quality of life, exercise capacity, N-terminal pro-brain natriuretic peptide, and possibly the burden of heart failure hospitalizations (7).

Although the promising result, it is still unclear in the literature the effect of BAT in patients with heart failure. Thus, the aim of this study was to retrieve and assess the available data in the literature about the safety and efficacy of baroreflex activation therapy in heart failure patients, through a rapid systematic review of clinical studies.

## **Methods**

### **Protocol and registration**

This rapid review was designed using as guidance the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) (11) and is registered in

the Prospero (International Prospective Register of Systematic Reviews) database (12), under the code [].

### **Eligibility criteria**

We included full peer reviewed publications of clinical studies (randomized or not), including patients with HF undergoing BAT, with or without control group, assessing safety and efficacy outcomes. Abstract from conferences were included if they provided enough information to judge eligibility and evaluate the outcomes. We excluded case reports and literature reviews.

### **Information sources and literature search**

We searched the following electronic databases: PubMed, EMBASE, CENTRAL, Scopus and Web of Science. In addition, we searched the references of the included articles manually, as well as performed a citation analysis of the included studies using google scholar. The initial search comprised the Mesh term "Heart Failure" followed by its related entry terms and other free terms, and free terms related to "baroreflex activation therapy". We did not use limits for language or date when conducting the searches.

### **Study selection**

Titles and abstract of the retrieved articles were independently evaluated by one reviewer. Abstracts which do not provide enough information regarding the eligibility criteria will be kept for full-text evaluation. One reviewer evaluated full-text articles and determine study eligibility.

### **Data abstraction**

One reviewer conducted data extraction and included: study title, author, journal and year of publication, study design, population, inclusion and exclusion criteria, study arms and sample size, intervention description, outcomes definitions, measurement and results (as presented in the included studies), and follow-up period.

### **Risk of bias assessment**

To assess the risk of bias of the RCT, we used the Cochrane Risk of Bias tool which considers bias related to selection, performance, detection, attrition, reporting and other possible (13). For the non-randomized studies, we used the ROBINS-I tool (Risk Of Bias In Non-randomized Studies - of Interventions), also from Cochrane Collaboration (14). The following types of bias were considered: bias due to confounding, bias in selection of participants into the study, bias in classification of interventions, bias due to deviations from intended interventions, bias due to missing data, bias in measuring of outcomes, bias in selection of the reported result, and overall bias. The evaluation was conducted independently by one reviewers.

### **Synthesis**

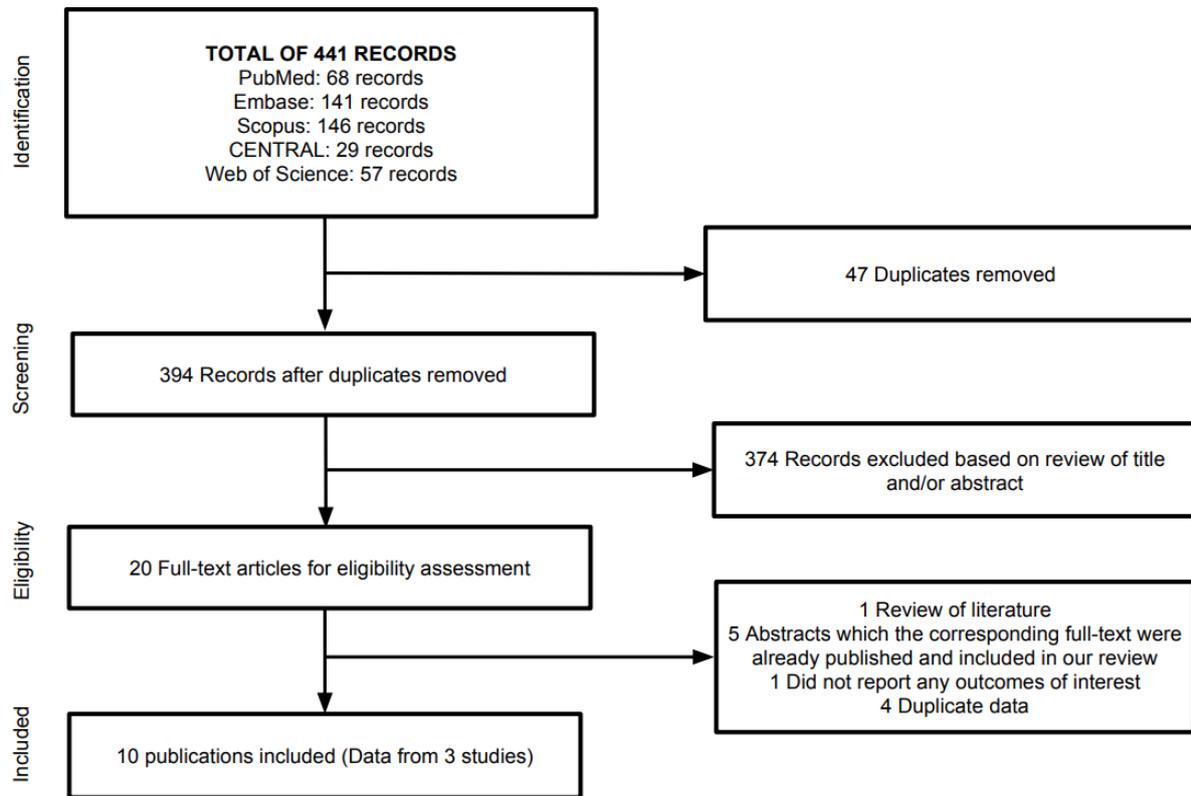
Descriptive analyses of studies will be performed including study characteristics and main results.

## **Results**

### **Study selection**

Our search strategies yielded 441 citations from the five electronic databases. After excluding duplicates and screening titles and abstracts for eligibility, 20 publications were kept for full text evaluation. Finally, 10 publications were included in our rapid review, representing data from 3 studies. Figure 1 demonstrates the study selection process.

Figure 1: Study selection process



## Study characteristics

### First study (reported in 3 publications and 1 conference abstract)

Gronda et al (2014) (6) was the first-in-human study evaluating BAT for HF published in the literature. The study included a series of 11 patients and reported a 6-month follow-up. A year later, another publication (15) reported the long-term follow-up of this study, including results at 12 and 21±5 months after intervention. In 2016, another article (16) reporting data from the same study was published. However, this publication added data from 9 controls, who were treated congestive HF patients to assess the effects of chronic baroreceptor activation on arterial stiffness. In 2017, the authors published an abstract in a conference (17) reporting the 42-month follow-up of those 11 patients. The main characteristics of these publications are described in Table 1.

**Second study (reported in 4 publications and 1 conference abstract)**

Study from Abraham et al (2015) (7), named HOPE4HF, was the first and only RCT found in the literature assessing BAT for HF patients. The study included 140 patients, mostly males, with a mean EF of  $24\pm 7\%$ . Still in 2015, a sub analysis of this RCT, study from Zile et al (18) was published comparing patients with or without cardiac resynchronization therapy (CRT). In 2016, Weaver et al (19) published the intraoperative experience and the 12-month safety and efficacy results of the HOPE4HF trial. A year after, Watcher et al (2017) (20) presented an abstract in a conference reporting another sub analysis of the HOPE4HF trial comparing patients with systolic blood pressure equal or lower to 16 mmHg with greater than 16 mmHg. Last, Halbach et al (2018) (21) published one more sub analysis of the same trial in the literature, separating patients with or without coronary artery disease. The main characteristics of these publications are described in Table 1.

**Third study (reported in 1 conference abstract)**

Mueller-Ehmsen et al (2015) (22) published an abstract in a conference reporting the European experience with BAT in HF with reduced EF. The abstract included the results of 57 patients from centers in Germany, Italy and France. We could not find a full text of this study; thus, we understand it was not published yet. The main characteristics of this study are described in Table 1.

Table 1: Studies characteristics.

Study, Year	Study design	Population	Study arms, if applicable	Number of patients	Age (Mean±SD)	Female N(%)	Hypertension N(%)	LVEF Mean±SD (%)	Outcomes	Follow-up (Months)
Gronda et al, 2014	Single center, open label study	HF patients NYHA Class III, EF < 40%, optimized medical therapy, and ineligible for CRT	Single arm	11	67±9	3(27.3)	NA	31±7	MSNA, changes in NYHA functional class and quality-of-life score	1, 3 and 6
Gronda et al, 2015 - Long term follow-up of Gronda et al, 2014	Single center, open label study	HF patients NYHA Class III, EF < 40%, optimized medical therapy, and ineligible for CRT	Single arm	11 (9 alive at the end of the follow-up)	67±9	3(27.3)	NA	31±7	MSNA, baroreflex sensitivity data and hospitalization rate, changes in NYHA functional class and quality-of-life score.	6 and 21.5±4.2
Gronda et al, 2016 - Partially duplicated population with Gronda et al, 2014	Single center, open label study	NYHA Class III HF/EF patients	BAT	9	66.1±8	1(11.1)	NA	32.4±8	Arterial stiffness - Pulse wave velocity	3

Gronda et al, 2017 - Long term follow-up of Gronda et al, 2014 [Abstract]	Single center, open label study	HF patients NYHA Class III, EF < 40%, optimized medical therapy, and ineligible for CRT	Single arm	11 (7 alive at the end of the follow-up)	NA	NA	NA	NA	35.6±6	MSNA, quality-of-life score, 6-minute hall walk distance, LVEF, hospitalization	21.5±4.7 and 41.5±3.5
Abraham et al, 2015 HOPE4 HF Study	RCT	Chronic HF with LVEF of 35% or less	BAT - Barotism neo system	71	64±7	9(12.7)	19(57.6)	24±7		System- and procedure-related major adverse neurological and cardiovascular events, changes in NYHA functional class, quality-of-life score, and 6-minute hall walk distance.	3 and 6
Zile et al, 2015 - Sub Analyses of HOPE4 HF Study	RCT	Chronic HF with LVEF of 35% or less	Control - Standard medical therapy	69	66±1	11(15.9)	21(56.8)	25±7			
			CRT (Divided in BAT and control)	45 (24 BAT and 21 control)	68±9	9(8.9)	8(36.4)	24±6		Changes in NYHA functional class, quality-of-life score, and 6-minute hall walk distance.	6
			No-CRT	95	63±1	16(16.8)	32(66.7)	25±7			
			(Divided in BAT and control)	(47 BAT and 48 control)							

Weaver et al, 2016 - Long-term follow-up of HOPE4 HF Study	RCT	Chronic HF with LVEF of 35% or less	BAT - Barotism neo system	71	64±7	9(12.7)	19(57.6)	24±7	12	System- and procedure-related major adverse neurological and cardiovascular events, changes in NYHA functional class, quality-of-life score, and 6-minute hall walk distance.
			Control - Standard medical therapy	69	66±1	11(15.9)	21(56.8)	25±7		
Wachter et al, 2017 - Sub Analyses of HOPE4 HF Study [Abstract]	RCT	Chronic HF with LVEF of 35% or less	SBP≤16 mmHg (Divided in BAT and control)	71 (42 BAT and 29 control)	NA	NA	NA	NA	6	Changes in NYHA functional class, quality-of-life score, and 6-minute hall walk distance.
			SBP>16 mmHg (Divided in BAT and control)	69 (29 BAT and 40 control)	NA	NA	NA	NA		
Halbach et al, 2018 - Sub Analyses of HOPE4	RCT	Chronic HF with LVEF of 35% or less	CAD (Divided in BAT and control)	101 (52 BAT and 49 control)	NA	NA	NA	NA	6	Changes in NYHA functional class, quality-of-life score, and 6-minute hall walk distance.

HF Study

no-CAD	39	NA	NA	NA	NA	NA	Changes in NYHA functional class, quality-of-life score, HF medications and renal function	6
(Divided in BAT and control)		(19 BAT and 20 control)						
Single arm	57	NA	NA	NA	NA	NA		

Mueller-Ehmsen et al, 2015 [Abstract]

Multicenter, open label study

HF patients NYHA Class III, EF ≤ 40%

RCT: randomized controlled trial, HF: heart failure, LVEF: left ventricular ejection fraction, BAT: baroreflex activation therapy, NYHA: New York Heart Association, SBP: Systolic blood pressure, CAD: coronary artery disease, CRT: cardiac resynchronization therapy, MSNA: Muscle sympathetic nerve activity, HFrEF: heart failure with reduced ejection fraction

## **Risk of bias**

Risk of bias was assessed in Gronda et al (6,15,16,23) and HOPE4HF (3,7,18–20) studies. We did not assess risk of bias of the Mueller-Ehmsen et al (2015) (22) because the abstract did not provide enough information to allow it. The study from Gronda et al was considered of low risk of bias due to confounding, selection of participants, missing data, and selection of the reported result; and of moderate risk of bias due to classification of intervention, deviations from intended interventions, and measuring of outcomes. HOPE4HF trial was considered of low risk of bias related to selection, performance, detection, attrition and reporting.

## **Synthesis of results**

### **Safety**

Both, study from Gronda and the HOPE4HF trial, used the same delivery system, the Barostim neo, CVRx, Inc, Minneapolis, MN, USA. The system consists of a pulse generator similar in size and shape to an implanted defibrillator coupled with a carotid sinus lead. The device is implanted subcutaneously in the right or left pectoral region with the lead tunneled from a small (2.5 – 5 cm) cutaneous incision to affix over the ipsilateral carotid bifurcation. Safety related to this system has been previously reported (24) and comparable to a pacemaker. Study from Mueller-Ehmsen et al (22) did not report details on the BAT system used, however it mentions that the system safety profile is similar to a pacemaker. Thus, we believe they may have used the same system in their study. Table 2 describes the system and procedure-related events reported in the included studies.

Table 2: Summary of the reported system and procedure-related events reported in the included studies

Study, Year	Number of patients submitted to BAT	BAT system	System and procedure-related events
Gronda et al (6,15,16,23)	11	Barostim neo, CVRx, Inc, Minneapolis, MN, USA	1 reported event. The patient experienced anemia requiring a transfusion during the implant. The patient recovered with no residual effects.
HOPE4HF study (3,7,18–20)	71	Barostim neo, CVRx, Inc, Minneapolis, MN, USA	The rate of freedom from system and procedure-related complications was 86% through 12 months. There were 2 MANCE events (hematomas) which occurred during the 6 first months after BAT. In addition, the study reported 3 more events: urinary tract infection secondary to urinary retention, hypotension and transection of the transverse cervical skin nerve. The complications that did occur were generally mild and short-lived.
Mueller-Ehmsen et al (22)	57	Details are not reported in the abstract.	The abstract did not report any events neither data on safety. It is only mentioned that the system safety profile was similar to a pacemaker.

BAT: baroreflex activation therapy; MANCE: major adverse neurologic and cardiovascular events

## Efficacy

### Changes in NYHA class

NYHA HF class measurement was reported in all three studies, and in 9 of the 10 publications. Gronda et al (6,15) reported improvements in NYHA class of HF at 3, 6 and 21.5±4.2-month follow-ups. The report of the 4-year follow-up did not show data on this outcome. Improvements in class of HF were also demonstrated in the original publication (7) and all the sub analyses (3,18–20) of the HOPE4HF study, in patients undergoing BAT at 6 months when compared to baseline. Similarly, the study from Mueller-Ehmsen et al (2015) (22) reported also reported improvement of NYHA class of HF at 6-month follow-up. Detailed data on this outcome is shown on Table 3.

### Quality of life

Quality of life was measured in the three studies and reported in all publications. Improvements in this outcome were described in all comparison, except

for patients making use of cardiac resynchronization therapy undergoing BAT, when compared to controls (patients making use of cardiac resynchronization therapy undergoing BAT) ( $P=0.23$ ). Details on quality of life results are described in Table 2.

### **Six-minute walk test**

Six-minute walk test was applied in all studies and results were available in all publications. Most of the reported improvements in this outcomes, except for three patients group: patients making use of cardiac resynchronization therapy undergoing BAT, when compared to controls (patients making use of cardiac resynchronization therapy not undergoing BAT) ( $P=0.38$ ); patients with systolic blood pressure less than 116mmHg undergoing BAT, when compared to controls (patients with systolic blood pressure less than 116mmHg not undergoing BAT) ( $P=0.08$ ); and patients without coronary artery disease undergoing BAT, when compared to patients without coronary artery disease not undergoing BAT ( $P=0.84$ ). These results are described in detail in Table 2.

### **Hospitalization**

Hospitalization was described in two studies and seven publications. Most of the publications reported lower rates of hospitalization after BAT. There was no difference when compared patients making use of cardiac resynchronization therapy undergoing and not undergoing BAT, patients not making use of cardiac resynchronization therapy undergoing and not undergoing BAT, patients with coronary artery disease undergoing BAT or not, and patients without coronary artery disease undergoing BAT or not. Details on the hospitalization rates presented in each publication are described in Table 2.

Table 3: Main efficacy summary results.

Study, Year	Study arms, N	NYHA class	QoL	6-minute hall walk distance (m)	Hospitalizations
Gronda et al, 2014	BAT, 11	Baseline: 11 patients at Class III 3-month variation: 6 patients at class II and 5 patients at class I 6-month variation: 1 patient at class III, 2 patients at class I and 5 patients at class I P<0.001 at both 3 and 6-month follow-up	Baseline: 33.4±29.8 3-month variation: -1.7±4.4 6-month variation: -10.6±3.8 P=0.007 Questionnaire: Minnesota Living with Heart Failure score	Baseline: 304.4±49.6 3-month variation: +49.7±15.7 6-month variation: +51.1±25.6 P=0.05	6 months before intervention: 8 of the 11 patients were hospitalized (total of 125 days) 6 months after intervention: 1 of the 11 patients was hospitalized (total of 6 days)
Gronda et al, 2015 - Long-term follow-up of Gronda et al, 2014	BAT, 9 (2 of the 11 patients died)	21.5±4.2-month follow-up: All patients were at class I.	Baseline: 30.9±27.8 6-month variation: -1.5±4.6 21.5±4.2-month variation: -13.2±5.4 P=0.006 Questionnaire: Minnesota Living with Heart Failure score	Baseline: 306.4±52.4 6-month variation: +69.7±24.4 21.5±4.2-month variation: +58.4±33.4 P=0.01	12 months before intervention: 1.44±1.3 days/month. Total of 155 days of hospitalization (all patients together) 6 months after intervention: 0.13±0.33 days/months. Total of 7 days of hospitalization (all patients together) 21.5±4.2 months after intervention: 0.27±0.44 days/month. Total of 45 days of hospitalization (all patients together)
Gronda et al, 2017 - Long term follow-up of Gronda et al, 2014 [Abstract]	BAT, 7 (4 of the 11 patients died)	Not reported.	Baseline: 31.3±26.0 21.5±4.2-month: 17.7±9.2 41.5±3.5-month: 16.9±7.7 P<0.05 Questionnaire: Minnesota Living with Heart Failure score	Baseline: 306±36.2 21.5±4.2-month: 365±36.2 41.5±3.5-month: 425±116 P=0.001	Hospitalization rate (days/year/patient) Baseline: 17.18 21.5±4.2-month: 0.93 41.5±3.5-month: 0.87 P<0.001
Abraham et al, 2015 HOPE4HF Study	BAT, 71 Control, 69	6 months vs. baseline	6 months vs. baseline	6 months vs. baseline	6 months vs. baseline



	P<0.001				
Wachter et al, 2017 - Sub Analyses of HOPE4HF Study [Abstract]	6 months vs. baseline	6 months vs. baseline	6 months vs. baseline	6 months vs. baseline	Not reported.
	SBP $\leq$ 116 mmHg BAT: 42 Control: 29	SBP $\leq$ 116 mmHg BAT (n=37): -0.5 $\pm$ 0.1 Control (n=22): 0.0 $\pm$ 0.1 P=0.008	SBP $\leq$ 116 mmHg BAT (n=37): -18.7 $\pm$ 3.7 Control (n=22): 4.6 $\pm$ 5.6 P<0.01	SBP $\leq$ 116 mmHg BAT (n=32): 49.8 $\pm$ 14.9 Control (n=19): -20.8 $\pm$ 24.0 P=0.01	
	SBP >116 mmHg BAT: 29 Control: 40	SBP >116 mmHg BAT (n=27): -0.6 $\pm$ 0.1 Control (n=32): -0.3 $\pm$ 0.1 P=0.03	SBP >116 mmHg BAT (n=27): -15.6 $\pm$ 4.5 Control (n=32): 0.4 $\pm$ 3.6 P=0.007	SBP >116 mmHg BAT (n=24): 72.7 $\pm$ 26.4 Control (n=24): 19.1 $\pm$ 13.5 P=0.08	
		Questionnaire: Minnesota Living with Heart Failure score			
Halbach et al, 2018 - Sub Analyses of HOPE4HF Study	6 months vs. baseline	6 months vs. baseline	6 months vs. baseline	6 months vs. baseline	HF Hospitalizations (n)
	CAD BAT: 52 Control: 49	CAD BAT (n=47): -0.6 $\pm$ 0.1 Control (n=36): -0.2 $\pm$ 0.1 P=0.003	CAD BAT (n=47): -16.8 $\pm$ 3.4 Control (n=36): 1.7 $\pm$ 4.1 P<0.001	CAD BAT (n=41): 72.7 $\pm$ 17.2 Control (n=29): -6.6 $\pm$ 17.8 P=0.003	CAD BAT (n=41): -0.59 $\pm$ 0.26 Control (n=36): 0.10 $\pm$ 0.28 P=0.058
	no-CAD BAT: 19 Control: 20	no-CAD BAT (n=17): -0.4 $\pm$ 0.2 Control (n=18): -0.1 $\pm$ 0.2 P=0.21	no-CAD BAT (n=17): -18.9 $\pm$ 5.3 Control (n=18): 2.9 $\pm$ 4.9 P=0.005	no-CAD BAT (n=15): 23.7 $\pm$ 21.9 Control (n=14): 18.2 $\pm$ 16.6 P=0.84	no-CAD BAT (n=16): -0.25 $\pm$ 0.17 Control (n=14): -0.43 $\pm$ 0.31 P=0.86
		Questionnaire: Minnesota Living with Heart Failure score			HF Hospitalizations (days)
					CAD BAT (n=41): -7.32 $\pm$ 3.63 Control (n=36): 0.95 $\pm$ 2.23 P=0.048
					no-CAD BAT (n=16): -3.63 $\pm$ 2.80 Control (n=14): -2.14 $\pm$ 1.73 P=0.677
Mueller-Ehmsen et al, 2015 [Abstract]	BAT, 57	Baseline: 3.0 $\pm$ 0.0 6-month variation: -0.9 $\pm$ 0.1 P<0.001	Baseline: 44.1 $\pm$ 22.1 6-month variation (n=49): -14.4 $\pm$ 3.1	Baseline: 301.2 $\pm$ 81.2 6-month variation (n=43): 85.2 $\pm$ 15.2	Not reported.

N available: 50	P<0.001	P<0.001
Questionnaire: Minnesota Living with Heart Failure score		

BAT: baroreflex activation therapy, NYHA: New York Heart Association, SBP: Systolic blood pressure, CAD: coronary artery disease, CRT: cardiac resynchronization therapy.

### Other reported outcomes

Besides the reported outcomes above, the publications from Gronda et al (6,15,16,23) reported a serial measurement of muscle sympathetic nerve activity (MSNA). At a six-month follow-up, the study demonstrated a reduction from  $45.1 \pm 7.7$  to  $31.3 \pm 8.3$  bursts/min and from  $67.6 \pm 12.7$  to  $45.1 \pm 11.6$  bursts/100 heartbeats, decreases of 31% and 33%, respectively ( $P < 0.01$ ). The decrease was sustained through over the long-term follow-up ( $21.5 \pm 4.2$ ) with a difference of  $-15 \pm 2.6$  bursts/min ( $P < 0.001$ ) and  $-24.7 \pm 4.3$  bursts/100 heartbeats ( $P < 0.001$ ). At the 4-year follow-up, the study reported a measure of  $26 \pm 3$ , which was also significantly different from baseline ( $P < 0.001$ ).

The study from Gronda et al (2016) (16) also reported the effects of chronic carotid baroreceptor activation on arterial (aortic) stiffness in HF. Aortic stiffness was evaluated by pulse wave velocity (PWV) between the carotid and the femoral artery of the same side. The study reported non-significant change in PWV at the third month evaluation after BAT. Similarly, no differences were reported in the control group.

### Discussion

This review summarized the available evidence on the use of BAT for patients with HF. The results indicate that the therapy is safe and improve clinical outcomes such as NYHA class of HF, quality of life, six-minute walk test, and hospitalization rates; as well as in MSNA. The study evaluating arterial stiffness did not report any changes after therapy. The only RCT available reported an 86% rate of system and procedure-related complication-free, with no cranial nerve injuries.

The baroreceptors located at the carotid sinus have a well-known influence on the central autonomic nervous. Besides it, the sympathovagal imbalance plays in the progression of HF does. In this context, BAT consists in the stimulation of baroreceptors at the carotid sinus in order to decrease sympathetic and increase parasympathetic tone and, ultimately, provide additional beneficial effects on patients with HF (3,25).

Up to now, most of the studies in human subjects evaluating BAT focused on patients with resistant hypertension. A recent meta-analysis (26)

published in the literature assessing safety and efficacy of BAT in patients with resistant hypertension demonstrated that systolic and diastolic blood pressure decreased in patients who underwent BAT as early as 3 months and sustained up to 24 months after therapy (26). The review included 12 studies in the qualitative analysis and 5 in the meta-analysis.

In the HF field, although the promising results, there is much yet to learn to achieve conclusive results about the use of BAT for HF patients. Since the first-generation system, surgery duration, complexity and the safety of BAT system have improved significantly. The procedure is unique and requires a multiprofessional team. The available data indicates that, with proper training, the procedure is safe with a short-learning curve (19). In terms of efficacy, improvements in clinical outcomes have been reported in the included studies, as mentioned above. However, a pivotal trial is still need to make assertive conclusions.

This study has some limitations important to mention. Only 3 studies are available in the literature answering our review research question, and only one of them was designed as an RCT. In addition, three of the 10 included publications were only abstracts published in conferences and not peer review publications. The small sample size and the heterogeneity across the included studies lacked the power to make conclusive statements.

Importantly, we designed our study as a rapid systematic review. We did perform all the steps of a traditional systematic review; however, they were executed by only one reviewer. This approach has been previously described in the literature and its value has been recognized by important organizations, such as the Cochrane Collaboration. A rapid review has a shorten time of execution, making it possible to obtain results timely and with reduced costs.

Despite those limitations, to our knowledge, this is the first review using a systematic methodology which aimed to retrieve and report the available data on the safety and efficacy of BAT for patients with HF. We believe that our study can provide significant information to support future clinical trials and registries in this area.

In conclusion, the results of this review suggest that BAT is safe and improves clinical outcomes in HF patients. Although the promising results, there

is currently insufficient evidence on the safety and efficacy of BAT for patients with HF to draw meaningful conclusions. Further high-quality RCTs with long term follow-up are still needed in order to obtain conclusive results.

## References

1. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Baha MJ, et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* [Internet]. 2014 Jan 21;129(3):e28–292. Available from: <http://dx.doi.org/10.1161/01.cir.0000441139.02102.80>
2. Ambrosy AP, Fonarow GC, Butler J, Chioncel O, Greene SJ, Vaduganathan M, et al. The global health and economic burden of hospitalizations for heart failure: lessons learned from hospitalized heart failure registries. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2014 Apr 1;63(12):1123–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2013.11.053>
3. Halbach M, Fritz T, Madershahian N, Pfister R, Reuter H. Baroreflex Activation Therapy in Heart Failure With Reduced Ejection Fraction: Available Data and Future Perspective. *Curr Heart Fail Rep* [Internet]. 2016 Apr;13(2):71–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11897-016-0286-8>
4. Floras JS. Sympathetic nervous system activation in human heart failure: clinical implications of an updated model. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2009 Jul 28;54(5):375–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2009.03.061>
5. Ad N. Baroreflex Activation Therapy for Patients With Heart Failure and Low Ejection Fraction is Safe and Effective. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2016 Aug 23;28(2):329–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.semtcvs.2016.08.009>
6. Gronda E, Seravalle G, Brambilla G, Costantino G, Casini A, Alsheraei A, et al. Chronic baroreflex activation effects on sympathetic nerve traffic,

baroreflex function, and cardiac haemodynamics in heart failure: a proof-of-concept study. *Eur J Heart Fail* [Internet]. 2014 Sep;16(9):977–83.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ejhf.138>

7. Abraham WT, Zile MR, Weaver FA, Butter C, Ducharme A, Halbach M, et al. Baroreflex Activation Therapy for the Treatment of Heart Failure With a Reduced Ejection Fraction. *JACC Heart Fail* [Internet]. 2015 Jun;3(6):487–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchf.2015.02.006>
8. Sabbah HN, Gupta RC, Imai M, Irwin ED, Rastogi S, Rossing MA, et al. Chronic electrical stimulation of the carotid sinus baroreflex improves left ventricular function and promotes reversal of ventricular remodeling in dogs with advanced heart failure. *Circ Heart Fail* [Internet]. 2011 Jan;4(1):65–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.955013>
9. Sabbah HN. Baroreflex activation for the treatment of heart failure. *Curr Cardiol Rep* [Internet]. 2012 Jun;14(3):326–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11886-012-0265-y>
10. Zucker IH, Hackley JF, Cornish KG, Hiser BA, Anderson NR, Kieval R, et al. Chronic baroreceptor activation enhances survival in dogs with pacing-induced heart failure. *Hypertension* [Internet]. 2007 Nov;50(5):904–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.095216>
11. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *BMJ* [Internet]. 2009 Jul 21;339:b2535. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.b2535>
12. PROSPERO [Internet]. [cited 2018 Jun 19]. Available from: <https://www.crd.york.ac.uk/prospero/>
13. Higgins JPT, Altman DG, Gøtzsche PC, Jüni P, Moher D, Oxman AD, et al. The Cochrane Collaboration’s tool for assessing risk of bias in randomised

- trials. *BMJ* [Internet]. 2011 Oct 18;343:d5928. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.d5928>
14. Sterne JA, Hernán MA, Reeves BC, Savović J, Berkman ND, Viswanathan M, et al. ROBINS-I: a tool for assessing risk of bias in non-randomised studies of interventions. *BMJ* [Internet]. 2016 Oct 12;355:i4919. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.i4919>
  15. Gronda E, Seravalle G, Trevano FQ, Costantino G, Casini A, Alsheraei A, et al. Long-term chronic baroreflex activation: persistent efficacy in patients with heart failure and reduced ejection fraction. *J Hypertens* [Internet]. 2015 Aug;33(8):1704–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/HJH.0000000000000603>
  16. Gronda E, Brambilla G, Seravalle G, Maloberti A, Cairo M, Costantino G, et al. Effects of chronic carotid baroreceptor activation on arterial stiffness in severe heart failure. *Clin Res Cardiol* [Internet]. 2016 Oct;105(10):838–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00392-016-0992-y>
  17. Four years of baroreflex activation therapy in advanced heart failure: 3rd long- [Internet]. [cited 2018 Oct 28]. Available from: <https://esc365.escardio.org/Congress/Heart-Failure-2017-4th-World-Congress-on-Acute-Heart-Failure/Poster-Session-4-Devices-CRT-ICD-Surgery/153235-four-years-of-baroreflex-activation-therapy-in-advanced-heart-failure-3rd-long-term-follow-up-report-of-a-proof-of-concept-study>
  18. Zile MR, Abraham WT, Weaver FA, Butter C, Ducharme A, Halbach M, et al. Baroreflex activation therapy for the treatment of heart failure with a reduced ejection fraction: safety and efficacy in patients with and without cardiac resynchronization therapy. *Eur J Heart Fail* [Internet]. 2015 Oct;17(10):1066–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ejhf.299>
  19. Weaver FA, Abraham WT, Little WC, Butter C, Ducharme A, Halbach M, et al. Surgical Experience and Long-term Results of Baroreflex Activation Therapy for Heart Failure With Reduced Ejection Fraction. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2016 Jun 2;28(2):320–8. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1053/j.semtcvs.2016.04.017>

20. Wachter R, Abraham WT, Lindenfeld J, Weaver FA, Zannad F, Wilks S, et al. P1475 Positive effects of baroreflex activation therapy in heart failure with reduced ejection fraction are independent of baseline blood pressure. *Eur Heart J* [Internet]. 2017 Aug 1;38(suppl\_1). Available from: <http://academic.oup.com/eurheartj/article/doi/10.1093/eurheartj/ehx502.P1475/4088617/P1475Positive-effects-of-baroreflex-activation>
21. Halbach M, Abraham WT, Butter C, Ducharme A, Klug D, Little WC, et al. Baroreflex activation therapy for the treatment of heart failure with reduced ejection fraction in patients with and without coronary artery disease. *Int J Cardiol* [Internet]. 2018 Sep 1;266:187–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.04.075>
22. European experience with baroreflex activation therapy (BAT) in heart failure with reduced ejection fraction [Internet]. [cited 2018 Oct 27]. Available from: <https://esc365.escardio.org/Congress/Heart-Failure-2015/2nd-World-Congress-on-Acute-Heart-Failure-2015/Rapid-Fire-5-Chronic-heart-failure/115566-european-experience-with-baroreflex-activation-therapy-bat-in-heart-failure-with-reduced-ejection-fraction#abstract>
23. Four years of baroreflex activation therapy in advanced heart failure: 3rd long-term follow-up report of a proof-of-concept study [Internet]. [cited 2018 Oct 27]. Available from: <https://esc365.escardio.org/Congress/Heart-Failure-2017-4th-World-Congress-on-Acute-Heart-Failure/Poster-Session-4-Devices-CRT-ICD-Surgery/153235-four-years-of-baroreflex-activation-therapy-in-advanced-heart-failure-3rd-long-term-follow-up-report-of-a-proof-of-concept-study>
24. Hoppe UC, Brandt M-C, Wachter R, Beige J, Rump LC, Kroon AA, et al. Minimally invasive system for baroreflex activation therapy chronically lowers blood pressure with pacemaker-like safety profile: results from the Barostim neo trial. *J Am Soc Hypertens* [Internet]. 2012 Jul;6(4):270–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jash.2012.04.004>

25. Halbach M, Hicketier T, Madershahian N, Müller-Ehmsen J. Baroreflex activation therapy: a new treatment option for heart failure with reduced ejection fraction. *Expert Rev Cardiovasc Ther* [Internet]. 2014 Dec;12(12):1465–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1586/14779072.2014.979790>
26. Chunbin W, Fu S, Jing H. Efficacy and safety of baroreflex activation therapy for treatment of resistant hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Hypertens* [Internet]. 2018 Apr 6;40(6):501–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/10641963.2016.1273943>

---

**Pubmed search - 68 citations**

Search	Query	Items found
#3	Search (#1 AND #2)	68
#2	Search "Heart Failure"[Mesh] OR "Cardiac Failure"[Title/Abstract] OR "Heart Decompensation"[Title/Abstract] OR "Decompensation, Heart"[Title/Abstract] OR "Heart Failure, Right-Sided"[Title/Abstract] OR "Heart Failure, Right Sided"[Title/Abstract] OR "Right-Sided Heart Failure"[Title/Abstract] OR "Right Sided Heart Failure"[Title/Abstract] OR "Myocardial Failure"[Title/Abstract] OR "Congestive Heart Failure"[Title/Abstract] OR "Heart Failure, Congestive"[Title/Abstract] OR "Heart Failure, Left-Sided"[Title/Abstract] OR "Heart Failure, Left Sided"[Title/Abstract] OR "Left-Sided Heart Failure"[Title/Abstract] OR "Left Sided Heart Failure"[Title/Abstract]	135480
#1	Search "baroreflex activation"[Title/Abstract] OR barostim*[Title/Abstract] OR "baroreceptor stimulation"[Title/Abstract] OR "baroreceptor activation"[Title/Abstract] OR "carotid stimulation"[Title/Abstract] OR baroreceptor-activat*[Title/Abstract]	954

**CENTRAL search - 29 citations**

"baroreflex activation" OR barostim\* OR "baroreceptor stimulation" OR "baroreceptor activation" OR "carotid stimulation" OR baroreceptor-activat\* in Title Abstract Keyword AND "Heart Failure" OR "Cardiac Failure" OR "Heart Decompensation" OR "Decompensation, Heart" OR "Myocardial Failure" OR "Congestive Heart Failure" in Title Abstract Keyword - (Word variations have been searched)

**Scopus search - 146 citations**

("baroreflex activation" OR barostim\* OR "baroreceptor stimulation" OR "baroreceptor activation" OR "carotid stimulation" OR baroreceptor-activat\*) AND ("Heart Failure" OR "Cardiac Failure" OR "Heart Decompensation" OR "Decompensation, Heart" OR "Myocardial Failure" OR "Congestive Heart Failure")

**Web of Science search - 57 citations**

("baroreflex activation" OR barostim\* OR "baroreceptor stimulation" OR "baroreceptor activation" OR "carotid stimulation" OR baroreceptor-activat\*) AND ("Heart Failure" OR "Cardiac Failure" OR "Heart Decompensation" OR "Decompensation, Heart" OR "Myocardial Failure" OR "Congestive Heart Failure")

**Embase search - 141 citations**

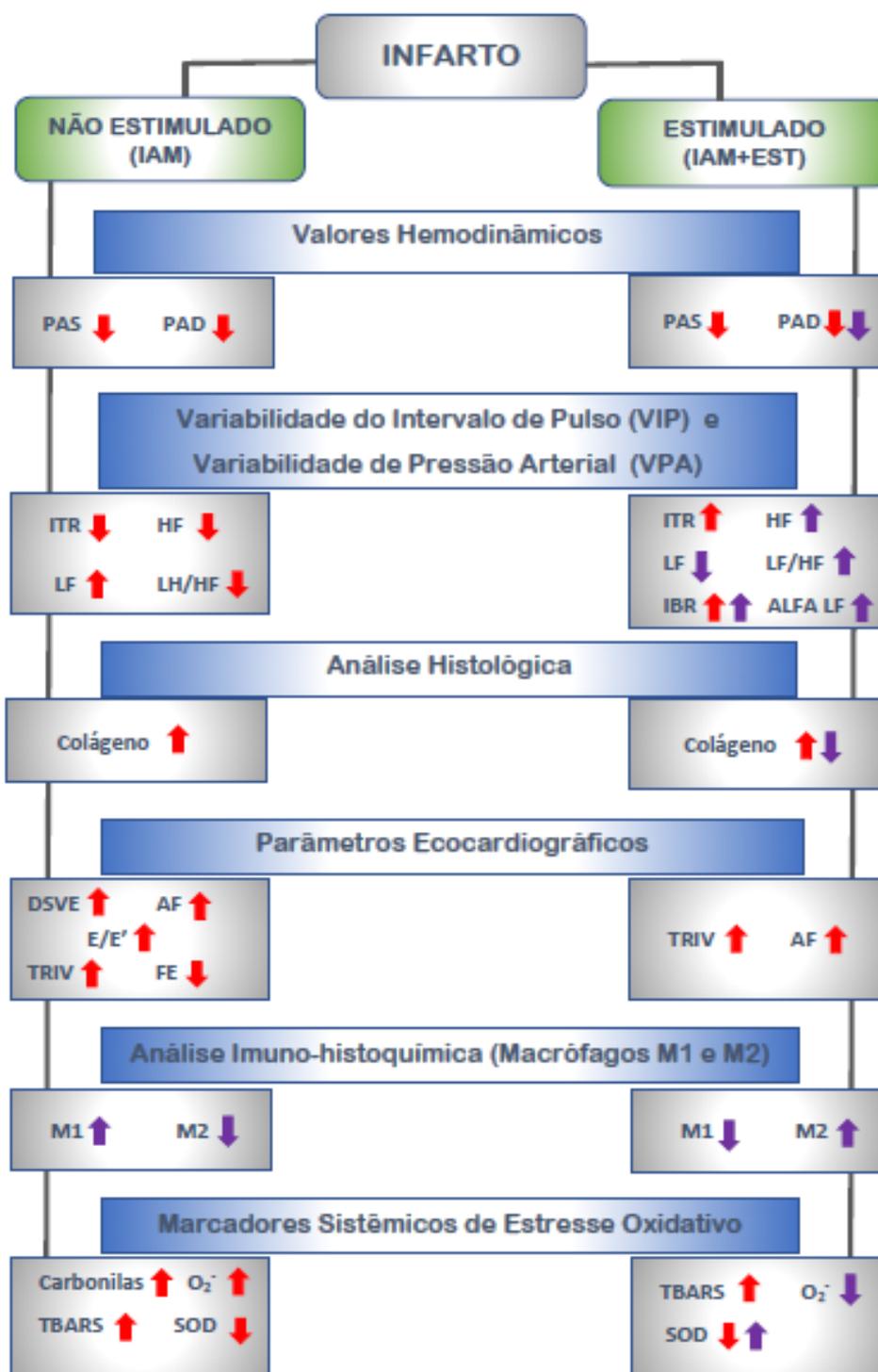
('baroreflex activation' OR barostim\* OR 'baroreceptor stimulation' OR 'baroreceptor activation' OR 'carotid stimulation' OR 'baroreceptor activat\*') AND ('heart failure'/de OR 'cardiac failure'/de OR 'heart decompensation'/de OR 'decompensation, heart'/de OR 'myocardial failure'/de OR 'congestive heart failure'/de)

## **6. DISCUSSÃO**

---

Um dos mais intrigantes processos da neuromodulação é a habilidade do sistema nervoso regular a imunidade inata e modular a inflamação (108). Existem três vias principais de neuromodulação: o eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal (124), a via anti-inflamatória colinérgica vagal (24, 125), e a via esplênica simpática anti-inflamatória (126). A modulação vagal da resposta inflamatória e o potencial benefício dessa modulação em diferentes modelos experimentais de síndromes inflamatórias vem sendo amplamente estudada nos últimos anos (127-131). Estudos recentes têm demonstrado que a estimulação vagal por meio da administração oral de brometo de piridostigmina em modelos de infarto experimental em ratos, foi capaz de modular a resposta inflamatória após o IAM bem como prevenir melhorar aspectos do reparo tecidual como a deposição de colágeno (19, 132). Bassi, et. al. (133), estudou o efeito da ativação barorreflexa em processo inflamatório de articulações em ratos acordados. Ele demonstrou que o efeito anti-inflamatório periférico da ativação dos barorreceptores foi devido à diminuição do drive simpático para o joelho, o que revelou uma nova rede neuronal no controle da inflamação periférica. O presente estudo foi o primeiro a testar o efeito da ativação do sistema barorreflexo na modulação da resposta inflamatória após IAM em ratos. A ativação desse sistema apresenta algumas vantagens sobre a estimulação vagal no que se refere à modulação autonômica. Enquanto a estimulação vagal age no ramo parassimpático do sistema nervoso autônomo e possui efeitos efetores muitas vezes indesejáveis sobre as vísceras, a estimulação do nervo depressor aórtico é mais seletiva e age sobre o SNC (portanto aferente) modulando assim tanto o sistema nervoso autônomo simpático como o sistema nervoso autônomo parassimpático por resposta efetora do SNC. É importante ressaltar também, que nosso trabalho foi o primeiro e único que conseguiu estimular o nervo depressor aórtico de forma direta e contínua por 30 minutos, duas sessões por dia, durante três dias consecutivos com o rato acordado. A técnica de estimulação elétrica utilizada no presente estudo foi desenvolvida e aprimorada no nosso laboratório. A mesma difere-se das demais técnicas já publicadas na literatura (108, 133) principalmente no que se refere ao tipo de corrente e à manipulação dos parâmetros da corrente elétrica utilizados.

A figura 35 mostra o resumo dos resultados do presente estudo em cada aspecto estudado e que será discutido posteriormente.



**Figura 35-** Resumo dos principais resultados do estudo. Seta Vermelha= $p \leq 0,05$  (IAM ou IAM+EST vs SHAM); Seta Azul=  $p \leq 0,05$  (IAM vs IAM+EST).

## **Valores hemodinâmicos, variabilidade do intervalo de pulso e variabilidade da pressão arterial**

Quando avaliada a PAS nos grupos experimentais no quarto dia pós IAM o presente estudo constatou uma diminuição da PAS nos grupos infartados quando comparados com o grupo SHAM. Essa diminuição da PAS é esperada devido à lesão cardíaca e acaba gerando uma taquicardia reflexa compensatória. O início imediato da taquicardia pós IAM e sua atenuação progressiva foi observada em estudos anteriores (134, 135). Apesar de não ser encontrada diferença estatisticamente significativa na FC entre os grupos avaliados, percebe-se que ambos os grupos infartados apresentam uma maior FC média em relação ao grupo SHAM. O grupo IAM+EST apresentou uma redução dessa taquicardia compensatória quando comparado com o grupo IAM. Essa diminuição na taquicardia compensatória pode estar relacionada com o valor de PAD significativamente menor no grupo IAM+EST quando comparado aos demais grupos. Esses dados sugerem que a pós carga (resistência vascular periférica) possa estar diminuída no grupo estimulado, possivelmente por diminuição da modulação simpática. A PAM foi significativamente menor nos grupos infartados quando comparados com o grupo SHAM. A ativação simpática e parassimpática para o coração e vasos trabalham em sincronia para a manutenção da homeostase dentro de limites adequados e necessários para prover aporte sanguíneo para todo o corpo (136). Portanto, a manutenção de reflexos normais de ajuste da pressão sanguínea é de fundamental importância para a homeostase cardiovascular (137). Na fase aguda do IAM, hiperatividade simpática parece ser uma adaptação para compensar a redução da performance mecânica cardíaca a fim de manter o débito cardíaco e a pressão sanguínea em condições de manter a perfusão tecidual (137). No entanto, em fases mais tardias pós IAM, o aumento do drive simpático pode levar a várias consequências deletérias para o coração, incluindo a facilitação de taqui-arritmias e o aumento do consumo de oxigênio no miocárdio. Portanto, vários processos adaptativos são ativados para restaurar o equilíbrio autonômico normal ao longo do tempo (138, 139). Em um estudo publicado em 2014 com ratos wistar, demonstrou-se que o drive de ativação simpática está aumentado logo aos 30 min pós oclusão da coronária e pode se manter aumentado por 4 semanas pós IAM (140). No presente estudo utilizamos a variabilidade do intervalo de pulso e a variabilidade da pressão arterial para acessar a modulação autonômica e a sensibilidade espontânea dos barorreceptores, bem como a

injeção de drogas vasoativas para avaliar a sensibilidade induzida dos barorreceptores. Assim como Passamani, et. al., 2014 (140), no presente estudo, encontrou-se um aumento da modulação simpática pós IAM. Observou-se que os componentes de LF apresentaram-se aumentados no grupo IAM quando comparado com o grupo SHAM. Quando avaliados os componentes de LF do IP no grupo IAM+EST, os mesmos foram estatisticamente menores quando comparados com os valores do grupo IAM, assemelhando-se aos valores de LF do grupo SHAM. Esse achado sugere que a estimulação elétrica foi capaz de reverter ou prevenir o aumento da modulação simpática provocado pelo IAM. Quando avaliados os componentes de HF do IP, observou-se que o componente HF do grupo IAM+EST foi estatisticamente maior quando comparado com o grupo IAM, assemelhando-se com o valor do componentes HF do grupo SHAM. Esses dados deixam evidente a capacidade da estimulação elétrica do NDA em modular a resposta adaptativa do sistema nervoso autônomo frente ao estímulo da isquemia cardíaca. Conforme citado anteriormente, foi avaliada no presente estudo a sensibilidade espontânea e induzida dos barorreceptores. Estudos prévios demonstraram uma sensibilidade barorreflexa diminuídas pós IAM em ratos, com uma recuperação progressiva ao padrão normal em até 8 semanas após o infarto (134, 141). A sensibilidade barorreflexa induzida, avaliada no presente estudo, foi representada pelos índices de taquicardia e bradicardia reflexas. Observou-se que o grupo IAM+EST apresentou um índice de taquicardia reflexa estatisticamente maior que o grupo IAM e semelhante ao grupo SHAM no quarto dia pós IAM. Quando avaliado o índice de bradicardia reflexa, o grupo IAM+EST apresentou um índice estatisticamente menor quando comparado com o grupo IAM e quando comparado com o grupo SHAM. Já a sensibilidade barorreflexa espontânea foi avaliada pela relação Alfa LF. O grupo IAM+EST apresentou uma sensibilidade barorreflexa espontânea maior quando comparado com o grupo IAM. Aires, et. al., 2017 (142), quando estudou a cronologia das mudanças na variabilidade de IP e de PA em ratos pós infarto do miocárdio, observou uma atenuação do componente LF da VPA. No presente estudo não foram observadas diferenças estatísticas nas variáveis de VPA estudadas. Quando estudada a variabilidade do IP no domínio do tempo, nosso estudo observou que, apesar de não haver diferença estatística, o grupo IAM+EST apresentou valores médios mais altos de SDRR e RMSSD quando comparado com os demais grupos estudados. Os dados do presente estudo referentes à hemodinâmica e à variabilidade do IP e PA, sugerem fortemente que a estimulação elétrica dos aferentes barorreceptores modula as adaptações

hemodinâmicas e autonômicas na fase aguda do reparo do miocárdio pós infarto experimental em ratos.

### **Parâmetros Ecocardiográficos**

A ecocardiografia desempenha um papel crucial na avaliação da função ventricular sistólica, na identificação de cardiopatias estruturais e na avaliação hemodinâmica, incluindo a classificação da disfunção diastólica (143). A ecocardiografia prediz de maneira satisfatória o tamanho da área de infarto na fase aguda e crônica pós oclusão da coronária (144). No presente estudo a ecocardiografia foi realizada no terceiro dia pós IAM. Observou-se a presença de área de infarto nos grupos IAM e IAM+EST. Não houve diferença de área infartada no terceiro dia pós IAM entre os grupos IAM e IAM+EST. Com relação às variáveis morfofuncionais avaliadas por meio da ecocardiografia no terceiro dia pós infarto, observou-se uma redução significativa da fração de ejeção no grupo IAM quando comparado com os grupos SHAM e IAM+EST. Apesar de não haver diferença em área de infarto entre os grupos infartados, o grupo IAM apresentou uma redução significativa na fração de ejeção quando comparada ao controle enquanto a mesma foi preservada no grupo IAM+EST, pois não foi diferente estatisticamente do grupo controle. Esse dado corrobora o achado de Li, et. al., 2015 (145), que demonstrou uma maior fração de ejeção em ratos infartados tratados com estimulação vagal quando comparados aos não estimulados. Verificou-se ainda que o diâmetro sistólico do VE foi maior no grupo IAM quando comparado com o grupo SHAM. Houve preservação do diâmetro sistólico no grupo IAM+EST, o que, juntamente com uma pressão de enchimento preservada, pode justificar a não diminuição da fração de ejeção no grupo IAM+EST. Quando se analisou a função diastólica do VE no presente estudo, foi possível observar que os dois grupos infartados apresentaram um valor de TRIV maior que o grupo SHAM. Não houve diferença dos valores de TRIV entre os dois grupos infartados. Outro parâmetro utilizado no presente estudo para avaliar a função diastólica foi a relação  $E/E'$ . Vários estudos têm validado e confirmado a correlação dessa razão com a pressão de enchimento, bem como seu poder de predição (146, 147). No presente estudo, verificou-se que o grupo IAM apresentou uma maior relação  $E/E'$  quando comparado com o grupo SHAM. A estimulação elétrica do nervo depressor

aórtico parece ter conservado essa relação no grupo IAM+EST. Os achados do presente estudo evidenciam que a estimulação elétrica do NDA de certa forma preservou a função ventricular do grupo IAM+EST, mostrando-se uma abordagem importante na prevenção ou resolução de complicações pós IAM.

### **Avaliação histopatológica da lesão - colágeno**

O conteúdo de colágeno desempenha papel crítico na manutenção da arquitetura e da função cardíaca. No processo de remodelação, entretanto, pode ocorrer desequilíbrio entre a síntese e degradação do colágeno com diversos efeitos deletérios (34). Dessa forma, o manejo em pacientes infartados deve incluir a modulação terapêutica da matriz de colágeno no miocárdio que deve ser traçada no sentido de preservar a matriz fisiológica de colágeno cardíaco e prevenir ou eliminar o acúmulo patológico de tecido fibrótico (35). Os bloqueadores da ECA e os bloqueadores beta-adrenérgicos têm encontrado uma importante aplicação clínica no controle do remodelamento ventricular e prevenção da IC após infarto do miocárdio (IM) (148-150). Lembrando, portanto, que tanto a ativação do sistema renina angiotensina como a hiperatividade simpática, que normalmente ocorrem após o IAM, podem contribuir para o aumento do colágeno e conseqüentemente da hipertrofia compensatória.

Adicionalmente, um dos mecanismos que pode estar participando dessa resposta de deposição do colágeno no miocárdio infartado é a atividade dos barorreceptores, cuja resposta às variações espontâneas ou induzidas da PA estão reduzidas em comparação aos indivíduos intactos.

Nesse sentido, um estudo conduzido pelo nosso laboratório, demonstrou que a desnervação sino-aórtica (privação da atividade barorreflexa) gerou um remodelamento cardíaco concêntrico em ratos hipertensos, com aumento do diâmetro dos cardiomiócitos e importante crescimento do conteúdo de colágeno (151). Em contraste, no presente estudo, onde estimulou-se eletricamente o NDA (responsável pela aferência barorreceptora), foi possível observar que houve uma menor deposição de colágeno no grupo IAM+EST quando comparado com o grupo IAM (não estimulado). Além de menor conteúdo de colágeno, observou-se também no grupo IAM+EST um aspecto estrutural que se assemelha mais ao colágeno do coração do grupo SHAM. Em contraste, no grupo

IAM essas fibras possuem uma estrutura mais grossa e com o aspecto das *fibras colágenas* típicas dos tecidos fibróticos cicatriciais. Esses achados evidenciam que os barorreceptores desempenham um papel importante tanto em um remodelamento adaptativo do miocárdio a uma disfunção cardiovascular (como por exemplo na hipertensão) como no reparo de uma lesão cardíaca (que é o caso do IAM). De fato, trabalho anterior de nosso grupo, mostra que o prejuízo adicional da função dos barorreceptores induzido pela desnervação sinoaórtica após IAM modifica a expressão da serca e de outras proteínas associadas ao cálcio prejudicando ainda mais a função cardíaca desse grupo (152).

### **Avaliação da proporção de macrófagos na região peri-lesão do IAM por imunohistoquímica**

A isquemia do miocárdio desencadeia uma resposta bifásica das células circulantes; um estágio inicial pró-inflamatório apresentando infiltração de neutrófilos e macrófagos M1 seguido por uma subsequente resposta com recrutamento de macrófagos M2 não-inflamatórios (18, 153). Um estudo prévio com estimulação vagal direta verificou a redução na infiltração de neutrófilos e macrófagos na área de infarto em um modelo de isquemia/reperfusão (154). Esse achado corrobora o resultado encontrado no presente estudo, onde observou-se um menor número de macrófagos M1 por campo na região peri-infarto no grupo IAM+EST quando comparado com o grupo IAM. Calvillo et. al., 2011 (155), verificou que a estimulação vagal, através de sua ação nicotínica, reduz a área de infarto e limita o processo inflamatório em um modelo de isquemia/reperfusão. Leblond, et. al., 2015 (156), estudou os efeitos da depleção de macrófagos M2 no processo de reparo pós IAM em camundongos e seus achados indicaram que uma depleção direta dos macrófagos M2 facilita a persistência de macrófagos M1 e retarda a resolução da inflamação pós IAM.

Um estudo conduzido por Rocha, et. al., 2016 (132), encontrou uma maior quantidade de macrófagos M2 na região peri-infarto no terceiro dia pós IAM em ratos tratados com estimulação vagal por administração de um agente periférico inibidor da colinesterase. O mesmo resultado foi encontrado no presente estudo, onde verificou-se um maior número de macrófagos M2 por campo de região peri-lesão no grupo IAM+EST

quando comparado com o grupo IAM. Esses achados indicam que a resposta inflamatória após IAM se modificou em favor dos macrófagos M2 e que, embora não se tenha observado redução da área de infarto, esses achados podem estar associados à preservação de um colágeno mais funcional no grupo estimulado. Resultados semelhantes foram observados previamente por nosso grupo publicados no trabalho de Bezerra, et. al., 2017 (19), que pesquisou os efeitos anti-inflamatórios da administração de brometo de piridostigmina (estimulador vagal) durante a fase proliferativa do reparo cardíaco pós IAM em ratos e encontrou uma distribuição diferente dos macrófagos M1 na região peri-infarto, mas não houve diferença estatística quanto à contagem dos mesmos entre os grupos tratado e não-tratado. No que se refere à contagem de macrófagos M2, o mesmo estudo mostrou um maior número desses macrófagos no grupo tratado com brometo de piridostigmina. Nesse sentido, verifica-se que a modulação autonômica, seja por estimulação vagal (elétrica ou medicamentosa) ou por modulação da atividade periférica do vago (e do simpático) sobre o coração (estimulação do NDA), interfere no processo inflamatório pós IAM diminuindo a infiltração de macrófagos M1 e antecipando o aparecimento de macrófagos de ação anti-inflamatória M2.

### **Marcadores sistêmicos do estresse oxidativo**

O estresse oxidativo é uma condição na qual substâncias oxidantes exercem efeitos deletérios em componentes celulares ou por sua produção aumentada, e/ou por alteração nos mecanismos celulares de proteção contra os mesmos. Em condições normais, existe um equilíbrio entre a produção e remoção das espécies reativas de oxigênio (EROs). Se houver uma produção excessiva de EROs e/ou o mecanismo de defesa antioxidante for ineficiente, ocorrerá estresse oxidativo (157, 158).

Durante a isquemia cardíaca, a produção de EROs é aumentada e ocorrem alterações nos mecanismos antioxidantes. São várias as possíveis fontes de produção das EROs, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio, no coração (157), entre as quais se destacam a mitocôndria, o endotélio e as membranas das células do miocárdio (159-161).

A produção aumentada do ânion superóxido no infarto se origina de neutrófilos ativados e da auto oxidação de catecolaminas via formação de adrenocromo (162, 163).

O ânion superóxido também pode ser produzido via ciclooxigenase no metabolismo do ácido araquidônico durante a isquemia (160-162, 164). Ao avaliar-se os marcadores sistêmicos de estresse oxidativo no presente estudo, apesar de não termos observado aumento significativo de peróxido de hidrogênio pós infarto do miocárdio, encontrou-se um aumento de ânion superóxido no grupo IAM quando comparado ao grupo SHAM. Esse achado está de acordo com o disposto acima quando avaliados os marcadores de estresse oxidativo em estágios agudos da lesão e início do reparo. Esse aumento do ânion superóxido produz um efeito cardiotóxico e potencialmente induz a um maior dano ao miocárdio (163, 165). Nesse sentido, foi observado no grupo IAM um aumento sistêmico de proteínas oxidadas (carbonilas) e de lipoperoxidação (TBARS) quando comparado ao grupo SHAM, o que indica um maior dano oxidativo em biomoléculas. Como citado anteriormente, durante o processo isquêmico, além da produção de EROs estar aumentada, também encontramos uma alteração nos mecanismos de defesa contra esses oxidantes.

Os mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo apresenta-se em duas formas: antioxidantes enzimáticos e antioxidantes não-enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos incluem a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT). Os antioxidantes não-enzimáticos são representados por compostos sintetizados pelo organismo como, os hormônios sexuais, ácido úrico, melatonina, vitamina E e a glutathione reduzida (GSH) ou ingeridos através da dieta ou via suplementação (vitamina C, vitamina E, beta caroteno e grupos fenóis de plantas) (166). As enzimas de detoxificação de EROs, como SOD e CAT, são a primeira linha de defesa celular contra a lesão oxidativa, decompondo o  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  antes de interagir para formar o radical hidroxila mais reativo ( $\cdot OH$ ) (167, 168). Quando avaliada a defesa antioxidante nos grupos experimentais do presente estudo, apesar de não ter sido observada diferenças na defesa antioxidante não enzimática (FRAP), verificou-se uma diminuição da atividade da SOD no grupo IAM quando comparado com os demais grupos.

Diante do cenário apresentado no grupo IAM referente aos marcadores sistêmicos de estresse oxidativo - aumento de pró oxidantes, diminuição da atividade antioxidante, com consequente aumento de dano oxidativo, infere-se duas possibilidades: a enzima estaria sendo “consumida” para prevenir um aumento desse dano oxidativo; ou a baixa atividade enzimática antioxidante estaria favorecendo um aumento de EROs. Quando se avalia esses marcadores sistêmicos de estresse oxidativo no grupo IAM+EST,

verifica-se que esse grupo apresentou uma menor produção de ânion superóxido, bem como apresentou redução de proteínas oxidadas. Além disto, a atividade da enzima antioxidante SOD foi maior no grupo IAM+EST quando comparado com o grupo IAM. Dessa forma, verificou-se que estimulação elétrica dos aferentes dos barorreceptores modulou a produção de EROs e a atividade enzimática antioxidante no quarto dia pós IAM. Os achados do presente estudo em relação aos marcadores de estresse oxidativo sistêmicos estão de acordo com os resultados em coração de Bezerra, 2017 (19). Bezerra avaliou os marcadores de estresse oxidativo no ventrículo esquerdo de ratos infartados e infartados tratados com brometo de piridostigmina (um potente estimulador vagal) e encontrou um aumento de proteínas oxidadas bem como uma diminuição da atividade da enzima SOD nos ratos infartados não tratados. A estimulação vagal com brometo de piridostigmina foi capaz de aumentar a atividade da enzima SOD e diminuir o conteúdo carbonílico de proteínas. Um estudo com modelo de infarto em camundongo e estimulação nervosa vagal sugeriu que o sistema nervoso central modula o status redox cardíaco e o estímulo adrenérgico, e assim suprime a geração de EROs no coração em remodelamento (30). Outro estudo revelou que a estimulação vagal exerce cardioproteção por prevenção da disfunção mitocondrial cardíaca em modelo suíno de lesão de isquemia e reperfusão miocárdica (169). Os resultados do presente estudo, no que se refere aos marcadores sistêmicos do estresse oxidativo, sugerem que a estimulação elétrica do NDA que leva as informações dos barorreceptores ao sistema nervoso central, modula o estresse oxidativo em ratos infartados no quarto dia pós infarto experimental.

O presente estudo foi pioneiro na avaliação do efeito da estimulação elétrica do nervo depressor aórtico na modulação da resposta inflamatória pós IAM em ratos. Recentemente, muitas pesquisas têm estudado a neuroimunomodulação, e cada uma têm aberto caminho para entendermos melhor como ocorre essa integração. Muitos estudos confirmam que a estimulação vagal, por meio da ativação da via anti-inflamatória colinérgica, modula o processo inflamatório agudo e crônico em diferentes patologias. O presente estudo apresentou uma nova abordagem na modulação da inflamação em uma fase inflamatória aguda de origem isquêmica. A estimulação elétrica dos aferentes barorreceptores, mostrou-se eficaz no aumento da modulação parassimpática e diminuição da modulação simpática pós IAM mostrando uma possível relação entre o

aumento da modulação vagal (aqui avaliada pelo componente HF do IP) sobre a redução da resposta inflamatória e sua repercussão nessa condição.

**CONCLUSÃO**

---

Os dados do presente estudo sugerem fortemente que a estimulação elétrica do ADN foi capaz de modular a resposta inflamatória pós infarto agudo do miocárdio em ratos. Os ratos infartados receberam 5 sessões de trinta minutos de estimulação elétrica contínua e direta do NDA que foi capaz de diminuir a PAM em pelo menos 20 mmHg e também foi capaz mantê-la nessa queda mínima durante toda a sessão. A modulação autonômica pós IAM acessada por meio da VIP e da VPA mostrou que os ratos que foram submetidos às sessões de estimulação elétrica do NDA apresentaram uma modulação parassimpática maior e uma modulação simpática menor que os ratos não estimulados. A sensibilidade barorreflexa induzida e espontânea foi maior no grupo estimulado quando comparado ao não estimulado. Os ratos infartados estimulados apresentaram melhores valores de função sistólica e diastólica do VE que os ratos não estimulados, parâmetros esses obtidos por meio da ecocardiografia no terceiro dia pós IAM. Os ratos infartados estimulados apresentaram uma menor deposição de colágeno quando comparados com os ratos não estimulados. Esses, apresentaram uma deposição de colágeno mais intensa (fibrose intersticial) principalmente em áreas preservadas de miocárdio. Os ratos não estimulados apresentaram um maior estresse oxidativo sistêmico quando comparados com os ratos estimulados. A região peri-lesão dos ratos estimulados apresentou uma menor infiltração de macrófagos M1 inflamatórios e uma maior infiltração de macrófagos anti-inflamatórios M2 quando comparados com os ratos não estimulados.

Dessa forma, podemos concluir que a modulação da resposta inflamatória pela estimulação elétrica dos aferentes dos barorreceptores que possivelmente se deu por meio do aumento da modulação vagal foi capaz de modificar favoravelmente o curso natural da resposta à isquemia coronariana em ratos. Novos estudos são necessários para avaliar os efeitos dessa estimulação elétrica do NDA em fases mais avançadas de reparo e remodelamento cardíaco pós IAM elucidando os desfechos clínicos dessa modulação precoce da resposta inflamatória.

## **REFERÊNCIAS**

---

1. McAllon CJ, Boylan LM, Hamborg T, Stallard N, Osman F, Lim PB, et al. The changing face of cardiovascular disease 2000–2012: An analysis of the world health organisation global health estimates data. *International Journal of Cardiology*. 2016;224:256-64.
2. Cardiovascular Diseases [press release]. 2017.
3. Brasil., Saúde. Md, Brasil P. Doenças cardiovasculares são principal causa de morte no mundo. 29 Setembro 2017 ed2017.
4. Cardiologia SBd. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2016;107(3 Supl.3):1-83.
5. Parikh N., Gona P., Larson M.G., Fox C.S., Benjamin E.J., Murabito J.M., et al. Long-Term Trends in Myocardial Infarction Incidence and Case Fatality in the National Heart, Lung, and Blood Institute's Framingham Heart Study. *Circulation*. 2009;119(9):1203-10.
6. Lewis EF, Moye LA, Rouleau JL, Sacks FM, Arnold JMO, Warnica JW, et al. Predictors of Late Development of Heart Failure in Stable Survivors of Myocardial Infarction The CARE Study. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:1446-53.
7. Saparov A, Chen CW, Beckman SA, Wang Y, Huard J. The role of antioxidation and immunomodulation in postnatal multipotent stem cell-mediated cardiac repair. *Int J Mol Sci*. 2013;14(8):16258-79.
8. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac Remodeling—Concepts and Clinical Implications: A Consensus Paper From an International Forum on Cardiac Remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;35(3):569-82.
9. Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res*. 2012;110(1):159-73.
10. Paulus WJ. Cytokines and heart failure. *Heart Fail Monit*. 2000;1(2):50-6.

11. White HD, Norris, R. M., Brown, M. A., Brandt, P. W., Whitlock, R. M., & Wild, C. J. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation*. 1987;76(1):44-51.
12. Nah D.Y., M.Y. R. The Inflammatory Response and Cardiac Repair After Myocardial Infarction. *Korean Circ J*. 2009;39:393-8.
13. Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, et al. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation*. 1999;99(11):1492-8.
14. Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. *Experimental studies in rats. Cardiovasc Res*. 2002;55(2):329-40.
15. Birdsall HH, Green DM, Trial JA, Youker KA, Burns AR, MacKay CR, et al. Complement C5a, TGF- $\beta$ 1, and MCP-1, in Sequence, Induce Migration of Monocytes Into Ischemic Canine Myocardium Within the First One to Five Hours After Reperfusion. *Circulation*. 1997;95(3):684-92.
16. Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, et al. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res*. 2005;96(8):881-9.
17. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*. 2007;74(2):184-95.
18. Frangogiannis NG. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(11-12):1907-39.
19. Bezerra OC, Franca CM, Rocha JA, Neves GA, Souza PRM, Teixeira Gomes M, et al. Cholinergic Stimulation Improves Oxidative Stress and Inflammation in Experimental Myocardial Infarction. *Sci Rep*. 2017;7(1):13687.
20. Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Susarla S, Czura CJ, et al. Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. *J Vasc Surg*. 2002;36(6):1231-6.

21. Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Ulloa L, Yang H, et al. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Exp Med*. 2002;195(6):781-8.
22. Borovikova LV, Ivanovaa S, Nardia D, Zhanga M, Yanga H, Ombrellino M, et al. Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*. 2000;85(1-3):141-7.
23. Mina-Osorio P, Rosas-Ballina M, Valdes-Ferrer SI, Al-Abed Y, Tracey KJ, Diamond B. Neural signaling in the spleen controls B-cell responses to blood-borne antigen. *Mol Med*. 2012;18:618-27.
24. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature*. 2002;420(6917):853-9.
25. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*. 2003;421:384-8.
26. Guarini S, Altavilla D, Cainazzo MM, Giuliani D, Bigiani A, Marini H, et al. Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor-kappaB activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock. *Circulation*. 2003;107(8):1189-94.
27. Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S. Review article: Infliximab therapy for inflammatory bowel disease--seven years on. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;23(4):451-63.
28. Leib C, Katus HA, Kaya Z. Cholinergic control of inflammation in cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med*. 2013;23(2):46-51.
29. Timmers L, van Keulen JK, Hoefler IE, Meijs MF, van Middelaar B, den Ouden K, et al. Targeted deletion of nuclear factor kappaB p50 enhances cardiac remodeling and dysfunction following myocardial infarction. *Circ Res*. 2009;104(5):699-706.
30. Tsutsumi T, Ide T, Yamato M, Kudou W, Andou M, Hirooka Y, et al. Modulation of the myocardial redox state by vagal nerve stimulation after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2008;77(4):713-21.

31. Xiong J, Xue FS, Yuan YJ, Wang Q, Liao X, Wang WL. Cholinergic anti-inflammatory pathway: a possible approach to protect against myocardial ischemia reperfusion injury. *Chin Med J (Engl)*. 2010;123(19):2720-6.
32. Xiong J, Yuan Y, Xue F, Wang Q, Cheng Y, Li R, et al. Postconditioning with  $\alpha 7$ nAChR Agonist Attenuates Systemic Inflammatory Response to Myocardial Ischemia–Reperfusion Injury in Rats. *Inflammation*. 2012;35(4):1357-64.
33. Robbins SL, RS C. *Patologia – Bases Patológicas das Doenças*. 7th ed. Rio de Janeiro 2005.
34. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SA, Zornoff LA. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol*. 2016;106(1):62-9.
35. Gonzalez A, Ravassa S, Beaumont J, Lopez B, Diez J. New targets to treat the structural remodeling of the myocardium. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(18):1833-43.
36. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81(4):1161-72.
37. Graham HK, Horn M, Trafford AW. Extracellular matrix profiles in the progression to heart failure. European Young Physiologists Symposium Keynote Lecture- Bratislava 2007. *Acta Physiol (Oxf)*. 2008;194(1):3-21.
38. Dorn GW, 2nd. Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling. *Cardiovasc Res*. 2009;81(3):465-73.
39. Anand IS, Florea VG, Solomon SD, Konstam MA, Udelson JE. Noninvasive assessment of left ventricular remodeling: concepts, techniques, and implications for clinical trials. *J Card Fail*. 2002;8(6 Suppl):S452-64.
40. Zornoff LA, Paiva SA, Duarte DR, Spadaro J. Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications. *Arq Bras Cardiol*. 2009;92(2):150-64.

41. Biomarkers EGo. Biomarkers in cardiology--part 1--in heart failure and specific cardiomyopathies. *Arq Bras Cardiol.* 2014;103(6):451-9.
42. Steenman M, Chen YW, Le Cunff M, Lamirault G, Varro A, Hoffman E, et al. Transcriptomal analysis of failing and nonfailing human hearts. *Physiol Genomics.* 2003;12(2):97-112.
43. Asakura M, Kitakaze M. Global gene expression profiling in the failing myocardium. *Circ J.* 2009;73(9):1568-76.
44. de Jong S, van Veen TA, de Baker JM, Vos MA, HV vR. Biomarkers of myocardial fibrosis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011;57(5):522-35.
45. Mann DL. Innate immunity and the failing heart: the cytokine hypothesis revisited. *Circ Res.* 2015;116(7):1254-68.
46. Epelman S, Liu PP, Mann DL. Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(2):117-29.
47. Frieler RA, Mortensen RM. Immune cell and other noncardiomyocyte regulation of cardiac hypertrophy and remodeling. *Circulation.* 2015;131(11):1019-30.
48. Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, Nakamura M. Immune modulation: role of the inflammatory cytokine cascade in the failing human heart. *Curr Heart Fail Rep.* 2008;5(2):69-74.
49. Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(3):504-11.
50. Hill JH, Ward PA. The phlogistic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. *J Exp Med.* 1971;133(4):885-900.
51. Pinckard RN, Olson MS, Giclas PC, Terry R, Boyer JT, O'Rourke RA. Consumption of classical complement components by heart subcellular membranes in vitro and in patients after acute myocardial infarction. *J Clin Invest.* 1975;56(3):740-50.

52. Yasojima K, Kilgore KS, Washington RA, Lucchesi BR, McGeer PL. Complement gene expression by rabbit heart: upregulation by ischemia and reperfusion. *Circ Res.* 1998;82(11):1224-30.
53. Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, Marsh HC, Jr., Carson GR, Concino MF, et al. Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science.* 1990;249(4965):146-51.
54. Granger CB, Mahaffey KW, Weaver WD, Theroux P, Hochman JS, Filloon TG, et al. Pexelizumab, an Anti-C5 Complement Antibody, as Adjunctive Therapy to Primary Percutaneous Coronary Intervention in Acute Myocardial Infarction - The COMplement inhibition in Myocardial infarction treated with Angioplasty (COMMA) Trial. *Circulation.* 2003;108(10):1184-90.
55. Mahaffey KW, Granger CB, Nicolau JC, Ruzyllo W, Weaver D, Theroux P, et al. Effect of Pexelizumab, an Anti-C5 Complement Antibody, as Adjunctive Therapy to Fibrinolysis in Acute Myocardial Infarction The COMplement inhibition in myocardial infarction treated with thromboLYtics (COMPLY) Trial. *Circulation.* 2003;108:1176-83.
56. Armstrong PW, Granger CB, Adams PX, Hamm C, Holmes D, Jr., O'Neill WW, et al. Pexelizumab for acute ST-elevation myocardial infarction in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2007;297(1):43-51.
57. Meldrum DR, Dinarello CA, Cleveland JC, Jr., Cain BS, Shames BD, Meng X, et al. Hydrogen peroxide induces tumor necrosis factor alpha-mediated cardiac injury by a P38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Surgery.* 1998;124(2):291-6; discussion 7.
58. Akgur FM, Brown MF, Zibari GB, McDonald JC, Epstein CJ, Ross CR, et al. Role of superoxide in hemorrhagic shock-induced P-selectin expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279(2):H791-7.

59. Lakshminarayanan V, Beno DW, Costa RH, Roebuck KA. Differential regulation of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and tumor necrosis factor-alpha in endothelial and epithelial cells. *J Biol Chem.* 1997;272(52):32910-8.
60. Sellak H, Franzini E, Hakim J, Pasquier C. Reactive oxygen species rapidly increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation. *Blood.* 1994;83(9):2669-77.
61. Shingu M, Nobunaga M. Chemotactic activity generated in human serum from the fifth component of complement by hydrogen peroxide. *Am J Pathol.* 1984;117(2):201-6.
62. Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR. Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ Res.* 1984;54(3):277-85.
63. Richard VJ, Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Therapy to Reduce Free Radicals During Early Reperfusion Does Not Limit the Size of Myocardial Infarcts Caused by 90 Minutes of Ischemia in Dogs. *Circulation.* 1988;78(2):473-80.
64. Tanaka M, Stoler RC, FitzHarris GP, Jennings RB, Reimer KA. Evidence against the "early protection-delayed death" hypothesis of superoxide dismutase therapy in experimental myocardial infarction. Polyethylene glycol-superoxide dismutase plus catalase does not limit myocardial infarct size in dogs. *Circ Res.* 1990;67(3):636-44.
65. Uraizee A, Reimer KA, Murry CE, Jennings RB. Failure of superoxide dismutase to limit size of myocardial infarction after 40 minutes of ischemia and 4 days of reperfusion in dogs. *Circulation.* 1987;75(6):1237-48.
66. Flaherty JT, Pitt B, Gruber JW, Heuser RR, Rothbaum DA, Burwell LR, et al. Recombinant human superoxide dismutase (h-SOD) fails to improve recovery of ventricular function in patients undergoing coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation.* 1994;89(5):1982-91.
67. Murohara Y, Yui Y, Hattori R, Kawai C. Effects of superoxide dismutase on reperfusion arrhythmias and left ventricular function in patients undergoing thrombolysis for anterior wall acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1991;67(8):765-7.

68. Siwik DA, Chang DL, Colucci WS. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res.* 2000;86(12):1259-65.
69. Kumar AG, Ballantyne CM, Michael LH, Kukielka GL, Youker KA, Lindsey ML, et al. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium. *Circulation.* 1997;95(3):693-700.
70. Tarzami ST, Cheng R, Miao W, Kitsis RN, Berman JW. Chemokine expression in myocardial ischemia: MIP-2 dependent MCP-1 expression protects cardiomyocytes from cell death. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(2):209-21.
71. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost.* 2007;97(5):738-47.
72. Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA, Frangogiannis NG, Smith CW, Michael LH, et al. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation.* 1999;99(4):546-51.
73. Frangogiannis NG, Youker KA, Entman ML. The role of the neutrophil in myocardial ischemia and reperfusion. *EXS.* 1996;76:263-84.
74. Jordan JE, Zhao Z, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Research.* 1999;43:860-78.
75. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation.* 1983;67(5):1016-23.
76. Palazzo AJ, Jones SP, Anderson DC, Granger DN, Lefer DJ. Coronary endothelial P-selectin in pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1998;275(5 Pt 2):H1865-72.
77. Hansen MK, O'Connor KA, Goehler LE, Watkins LR, Maier SF. The contribution of the vagus nerve in interleukin-1beta-induced fever is dependent on dose. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;280(4):R929-34.

78. Watkins LR, Goehler LE, Relton JK, Tartaglia N, Silbert L, Martin D, et al. Blockade of interleukin-1 induced hyperthermia by subdiaphragmatic vagotomy: evidence for vagal mediation of immune-brain communication. *Neurosci Lett*. 1995;183(1-2):27-31.
79. Altavilla D, Guarini S, Bitto A, Mioni C, Giuliani D, Bigiani A, et al. Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway reduces NF-kappa activation, blunts TNF-alpha production, and protects against splanchnic artery occlusion shock. *Shock*. 2006;25(5):500-6.
80. Borovikova LV, Ivanova V, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000;405(6785):458-62.
81. de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol*. 2005;6(8):844-51.
82. Mioni C, Bazzani C, Giuliani D, Altavilla D, Leone S, Ferrari A, et al. Activation of an efferent cholinergic pathway produces strong protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Crit Care Med*. 2005;33(11):2621-8.
83. Saeed RW, Varma S, Peng-Nemeroff T, Sherry B, Balakhaneh D, Huston J, et al. Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *J Exp Med*. 2005;201(7):1113-23.
84. van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Bruno MJ, Larosa GJ, Ulloa L, et al. The vagus nerve and nicotinic receptors modulate experimental pancreatitis severity in mice. *Gastroenterology*. 2006;130(6):1822-30.
85. Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med*. 2004;10(11):1216-21.
86. Chapleau MW, Hajduczuk G, Abboud FM. Mechanisms of resetting of arterial baroreceptors: an overview. *Am J Med Sci*. 1988;295(4):327-34.

87. Krieger EM, Salgado HC, Michelini LC. Resetting of the baroreceptors. *Int Rev Physiol.* 1982;26:119-46.
88. Alnima T, Kroon AA, de Leeuw PW. Baroreflex activation therapy for patients with drug-resistant hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2014;12(8):955-62.
89. Bisognano JD, Bakris G, Nadim MK, Sanchez L, Kroon AA, Schafer J, et al. Baroreflex activation therapy lowers blood pressure in patients with resistant hypertension: results from the double-blind, randomized, placebo-controlled rheos pivotal trial. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(7):765-73.
90. Halbach M, Hickethier T, Madershahian N, Reuter H, Brandt MC, Hoppe UC, et al. Acute on/off effects and chronic blood pressure reduction after long-term baroreflex activation therapy in resistant hypertension. *J Hypertens.* 2015;33(8):1697-703.
91. Hoppe UC, Brandt MC, Wachter R, Beige J, Rump LC, Kroon AA, et al. Minimally invasive system for baroreflex activation therapy chronically lowers blood pressure with pacemaker-like safety profile: results from the Barostim neo trial. *J Am Soc Hypertens.* 2012;6(4):270-6.
92. Ding W, Zhou L, Bao Y, Zhou L, Yang Y, Lu B, et al. Autonomic nervous function and baroreflex sensitivity in hypertensive diabetic patients. *Acta Cardiol.* 2011;66(4):465-70.
93. Huang D, Zhou J, Su D, Yu W, Chen J. Variations of perioperative baroreflex sensitivity in hypertensive and normotensive patients. *Clin Exp Hypertens.* 2017;39(1):74-9.
94. Subha M, Pal P, Pal GK, Habeebullah S, Adithan C, Sridhar MG. Decreased baroreflex sensitivity is linked to sympathovagal imbalance, low-grade inflammation, and oxidative stress in pregnancy-induced hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 2016;38(8):666-72.
95. Harrison DG, Guzik TJ, Lob HE, Madhur MS, Marvar PJ, Thabet SR, et al. Inflammation, immunity, and hypertension. *Hypertension.* 2011;57(2):132-40.

96. Mattace-Raso FU, Verwoert GC, Hofman A, Witteman JC. Inflammation and incident-isolated systolic hypertension in older adults: the Rotterdam study. *J Hypertens*. 2010;28(5):892-5.
97. Sesso HD, Wang L, Buring JE, Ridker PM, Gaziano JM. Comparison of interleukin-6 and C-reactive protein for the risk of developing hypertension in women. *Hypertension*. 2007;49(2):304-10.
98. Krieger EM, Marseillan RF. Aortic Depressor Fibers in the Rat: An Electrophysiological Study. *Am J Physiol*. 1963;205:771-4.
99. Kobayashi M, Cheng ZB, Tanaka K, Nosaka S. Is the aortic depressor nerve involved in arterial chemoreflexes in rats? *Journal of the Autonomic Nervous System*. 1999;78:38-48.
100. Sapru HN, Gonzalez E, Krieger AJ. Aortic nerve stimulation in the rat: cardiovascular and respiratory responses. *Brain Res Bull*. 1981;6(5):393-8.
101. Douglas WW, Ritchie JM. Cardiovascular reflexes produced by electrical excitation of non-medullated afferents in the vagus, carotid sinus and aortic nerves. *J Physiol*. 1956;134(1):167-78.
102. Douglas WW, Ritchie JM, Schaumann W. Depressor reflexes from medullated and non-medullated fibres in the rabbits aortic nerve. *The Journal of Physiology*. 1956;132(1):187-98.
103. Douglas WW, Schaumann W. A study of the depressor and pressor components of the cat's carotid sinus and aortic nerves using electrical stimuli of different intensities and frequencies. *The Journal of Physiology*. 1956;132(1):173-86.
104. Fan W, Andresen MC. Differential frequency-dependent reflex integration of myelinated and nonmyelinated rat aortic baroreceptors. *Am J Physiol*. 1998;275(Heart Circ. Physiol. 44):H632-H40.
105. Fan W, Reynolds PJ, Andresen MC. Baroreflex frequency-response characteristics to aortic depressor and carotid sinus nerve stimulation in rats. *Am J Physiol*. 1996;271(6 Pt 2):H2218-27.

106. Fan W, Schild JH, Andresen MC. Graded and dynamic reflex summation of myelinated and unmyelinated rat aortic baroreceptors. *Am J Physiol.* 1999;277(3 Pt 2):R748-56.
107. De Angelis K, Leirner AA, Irigoyen MC, Cestari IA. Nonstimulated cardiomyoplasty improves hemodynamics in myocardial-infarcted rats. *Artif Organs.* 2001;25(11):939-43.
108. Brognara F, Castania JA, Dias DPM, Lopes AH, Fazan R, Jr., Kanashiro A, et al. Baroreflex stimulation attenuates central but not peripheral inflammation in conscious endotoxemic rats. *Brain Res.* 2018;1682:54-60.
109. Abboud FM. The Walter B. Cannon Memorial Award Lecture, 2009. Physiology in perspective: The wisdom of the body. In search of autonomic balance: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;298(6):R1449-67.
110. Cardiology ESo. Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *European Heart Journal.* 1996;17:354-81.
111. Malik M, Camm AJ. Components of Heart-Rate-Variability - What They Really Mean and What We Really Measure. *Am J Cardiol.* 1993;72(11):821-2.
112. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation.* 1978;58(6):1072-83.
113. Gundersen HJ, Osterby R. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'do more less well!'. *J Microsc.* 1981;121(Pt 1):65-73.
114. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979;11(4):447-55.
115. Junqueira LC, Montes GS. Biology of collagen-proteoglycan interaction. *Arch Histol Jpn.* 1983;46(5):589-629.

116. Pickering JG, Boughner DR. Quantitative assessment of the age of fibrotic lesions using polarized light microscopy and digital image analysis. *Am J Pathol.* 1991;138(5):1225-31.
117. Andrade GB, Ladeira SL, Battlehner CN, Saldiva PH, Caldini EG. Molecular and ultrastructural studies of the fibrotic lesions of bovine focal proliferative fibrogranulomatous panniculitis (Lechiguana). *Vet Res Commun.* 2008;32(1):65-74.
118. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res.* 2004;43(3):200-27.
119. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
120. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods.* 1980;38(1-2):161-70.
121. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *J Biol Chem.* 1969;244(22):6049-55.
122. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95(2):351-8.
123. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994;233:357-63.
124. Sternberg EM, Hill JM, Chrousos GP, Kamilaris T, Listwak SJ, Gold PW, et al. Inflammatory mediator-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation is defective in streptococcal cell wall arthritis-susceptible Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(7):2374-8.
125. Ulloa L. The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(8):673-84.
126. Martelli D, Yao ST, McKinley MJ, McAllen RM. Reflex control of inflammation by sympathetic nerves, not the vagus. *J Physiol.* 2014;592(7):1677-86.
127. Tracey KJ. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(6):418-28.

128. Cheng Z, Li-Sha G, Jing-Lin Z, Wen-Wu Z, Xue-Si C, Xing-Xing C, et al. Protective role of the cholinergic anti-inflammatory pathway in a mouse model of viral myocarditis. *PLoS One*. 2014;9(11):e112719.
129. Minutoli L, Squadrito F, Nicotina PA, Giuliani D, Ottani A, Polito F, et al. Melanocortin 4 receptor stimulation decreases pancreatitis severity in rats by activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Crit Care Med*. 2011;39(5):1089-96.
130. Du MH, Luo HM, Hu S, Lv Y, Lin ZL, L. M. Electroacupuncture improves gut barrier dysfunction in prolonged hemorrhagic shock rats through vagus anti-inflammatory mechanism. *World J Gastroenterol*. 2013;19(36):5988-99.
131. Zhang R, Wugeti N, Sun J, Yan H, Guo Y, Zhang L, et al. Effects of vagus nerve stimulation via cholinergic anti-inflammatory pathway activation on myocardial ischemia/reperfusion injury in canine. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(9):2615-23.
132. Rocha JA, Ribeiro SP, Franca CM, Coelho O, Alves G, Lacchini S, et al. Increase in cholinergic modulation with pyridostigmine induces anti-inflammatory cell recruitment soon after acute myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2016;310(8):R697-706.
133. Bassi GS, Brognara F, Castania JA, Talbot J, Cunha TM, Cunha FQ, et al. Baroreflex activation in conscious rats modulates the joint inflammatory response via sympathetic function *Brain, Behavior, and Immunity*. 2015;49:140-7.
134. Meyrelles SS, Mill JG, Cabral AM, Vasquez EC. Cardiac baroreflex properties in myocardial infarcted rats. *J Auton Nerv Syst*. 1996;60(3):163-8.
135. Jardine DL, Charles CJ, Ashton RK, Bennett SI, Whitehead M, Frampton CM, et al. Increased cardiac sympathetic nerve activity following acute myocardial infarction in a sheep model. *J Physiol*. 2005;565(Pt 1):325-33.
136. Moak JP, Goldstein DS, Eldadah BA, Saleem A, Holmes C, Pechnik S, et al. Supine low-frequency power of heart rate variability reflects baroreflex function, not cardiac sympathetic innervation. *Heart Rhythm*. 2007;4(12):1523-9.

137. Swenne CA. Baroreflex sensitivity: mechanisms and measurement. *Neth Heart J*. 2013;21(2):58-60.
138. Zipes DP. Influence of myocardial ischemia and infarction on autonomic innervation of heart. *Circulation*. 1990;82(4):1095-105.
139. McAlpine HM, Morton JJ, Leckie B, Rumley A, Gillen G, Dargie HJ. Neuroendocrine activation after acute myocardial infarction. *Br Heart J*. 1988;60(2):117-24.
140. Passamani LM, Abdala AP, Moraes DJ, Sampaio KN, Mill JG, Paton JF. Temporal profile and mechanisms of the prompt sympathoexcitation following coronary ligation in Wistar rats. *PLoS One*. 2014;9(7):e101886.
141. Kruger C, Kalenka A, Haunstetter A, Schweizer M, Maier C, Ruhle U, et al. Baroreflex sensitivity and heart rate variability in conscious rats with myocardial infarction. *Am J Physiol*. 1997;273(5 Pt 2):H2240-7.
142. Aires R, Pimentel EB, Forechi L, Dantas EM, Mill JG. Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in rats with myocardial infarction. *Braz J Med Biol Res*. 2017;50(1):e5511.
143. Park JH, TH. M. Use and Limitations of  $E/e'$  to Assess Left Ventricular Filling Pressure by Echocardiography. *J Cardiovasc Ultrasound*. 2011;19(4):169-73.
144. dos Santos L, Mello AF, Antonio EL, Tucci PJ. Determination of myocardial infarction size in rats by echocardiography and tetrazolium staining: correlation, agreements, and simplifications. *Braz J Med Biol Res*. 2008;41(3):199-201.
145. Li Y., Xuan Y.H., Liu S.S., Dong J., Luo J.Y., Z.J S. Short-term vagal nerve stimulation improves left ventricular function following chronic heart failure in rats. *Mol Med Rep*. 2015;12(2): 1709–16.
146. Ommen SR, Nishimura RA, Appleton CP, Miller FA, Oh JK, Redfield MM, et al. Clinical utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of left ventricular filling pressures: A comparative simultaneous Doppler-catheterization study. *Circulation*. 2000;102(15):1788-94.

147. Nagueh SF, Mikati I, Kopelen HA, Middleton KJ, Quinones MA, Zoghbi WA. Doppler estimation of left ventricular filling pressure in sinus tachycardia. A new application of tissue doppler imaging. *Circulation*. 1998;98(16):1644-50.
148. Lindpaintner K, Ganten D. The cardiac renin-angiotensin system. An appraisal of present experimental and clinical evidence. *Circ Res*. 1991;68(4):905-21.
149. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular enlargement following infarction is a modifiable process. *Am J Cardiol*. 1991;68(14):127D-31D.
150. Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJ, Jr., Cuddy TE, et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med*. 1992;327(10):669-77.
151. Moraes-Silva IC, De La Fuente RN, Mostarda C, Rosa K, Flues K, Damaceno-Rodrigues NR, et al. Baroreflex deficit blunts exercise training-induced cardiovascular and autonomic adaptations in hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010;37(3):e114-20.
152. Mostarda C, Rodrigues B, Medeiros A, Moreira ED, Moraes-Silva IC, Brum PC, et al. Baroreflex deficiency induces additional impairment of vagal tone, diastolic function and calcium handling proteins after myocardial infarction. *Am J Transl Res*. 2014;6(3):320-8.
153. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*. 2007;204(12):3037-47.
154. Olofsson PS, Rosas-Ballina M, Levine YA, Tracey KJ. Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity. *Immunol Rev*. 2012;248(1):188-204.
155. Calvillo L, Vanoli E, Andreoli E, Besana A, Omodeo E, Gnechi M, et al. Vagal stimulation, through its nicotinic action, limits infarct size and the inflammatory response to myocardial ischemia and reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011;58(5):500-7.

156. Leblond AL, Klinkert K, Martin K, Turner EC, Kumar AH, Browne T, et al. Systemic and Cardiac Depletion of M2 Macrophage through CSF-1R Signaling Inhibition Alters Cardiac Function Post Myocardial Infarction. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137515.
157. Penna C, Mancardi D, Rastaldo R, Pagliaro P. Cardioprotection: a radical view Free radicals in pre and postconditioning. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1787(7):781-93.
158. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
159. Wang P, Zweier JL. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem*. 1996;271(46):29223-30.
160. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Alfieri O, Visioli O. Myocardial damage during ischaemia and reperfusion. *Eur Heart J*. 1993;14 Suppl G:25-30.
161. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*. 1994;81(5):637-47.
162. Singal PK, Beamish RE, Dhalla NS. Potential oxidative pathways of catecholamines in the formation of lipid peroxides and genesis of heart disease. *Adv Exp Med Biol*. 1983;161:391-401.
163. Neri M, Cerretani D, Fiaschi AI, Laghi PF, Lazzerini PE, Maffione AB, et al. Correlation between cardiac oxidative stress and myocardial pathology due to acute and chronic norepinephrine administration in rats. *J Cell Mol Med*. 2007;11(1):156-70.
164. Ferrari R, Ferrari F, Benigno M, Pepi P, Visioli O. Hibernating myocardium: its pathophysiology and clinical role. *Mol Cell Biochem*. 1998;186(1-2):195-9.
165. Cerretani D, Riezzo I, Fiaschi AI, Centini F, Giorgi G, D'Errico S, et al. Cardiac oxidative stress determination and myocardial morphology after a single ecstasy (MDMA) administration in a rat model. *Int J Legal Med*. 2008;122(6):461-9.

166. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*. 2005;16(10):577-86.
167. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2000;47(3):446-56.
168. Akila, D'Souza B, Vishwanath P, D'Souza V. Oxidative injury and antioxidants in coronary artery bypass graft surgery: off-pump CABG significantly reduces oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 2007;375(1-2):147-52.
169. Shinlapawittayatorn K, Chinda K, Palee S, Surinkaew S, Kumfu S, Kumphune S, et al. Vagus nerve stimulation initiated late during ischemia, but not reperfusion, exerts cardioprotection via amelioration of cardiac mitochondrial dysfunction. *Heart Rhythm*. 2014;11(12):2278-87.

**ANEXOS**

---

**Anexo 1 - Folha de Aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA SDC 4052/14/032)**



A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 10/06/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **065/14** intitulado: **“Efeitos da estimulação do nervo depressor aórtico na modulação da resposta inflamatória pós infarto agudo do miocárdio em ratos”** que utilizará **50** animais da espécie **rato**, apresentado pelo Departamento de Comissão Científica do INCOR.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

**Pesquisador (a) Responsável: Maria Cláudia Costa Irigoyen**

**Pesquisador (a) Executante: Rodrigo Schmidt**

**CEUA-FMUSP, 10 de Junho de 2014**



**Dr. Eduardo Pompeu**  
**Coordenador**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais**