

JURACI APARECIDA ROCHA

Interação da atividade autonômica e
resposta imunomoduladora na fase aguda
do infarto do miocárdio experimental

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

Programa de Cardiologia

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

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rocha, Juraci Aparecida

Interação da atividade autonômica e resposta imunomoduladora na fase aguda do infarto do miocárdio experimental / Juraci Aparecida Rocha -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Cardiologia.

Orientadora: Fernanda Marciano Consolim Colombo

Descritores: 1.Infarto do miocárdio 2.Linfócitos T 3.Linfócitos T reguladores
4.Inflamação/imunologia 5.Via anti-inflamatória colinérgica 6.Neuroimunomodulação
7.Estimulação do nervo vago 8.Receptor alpha 7 nicotínico 9.Brometo de
piridostigmina 10. Ratos Wistar

USP/FM/DBD-288/13

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Orminda e Jardo (*in memoriam*)
que pelo exemplo deram um rumo a minha vida!

À minha filha Sofia
pela compreensão e respeito ao meu trabalho
Obrigada Tesouro!

Aos meus irmãos Cleide, Áureo e demais familiares
pela torcida e incentivo!

Ao meu irmão Jairo (*in memoriam*)
Perda precoce... Saudade infinita... Amor eterno!

“ Quem sabe concentrar-se numa coisa e insistir nela
como único objetivo, obtém, ao fim e ao cabo,
a capacidade de fazer qualquer coisa.”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dr^a Fernanda Consolim-Colombo que acreditou em meu potencial, abrindo-me as portas para um Universo riquíssimo de aprendizado e oportunidades. Admiro a sua ousadia e coragem em aceitar inovações e a paciência e sabedoria em transformar um sonho em realidade. Obrigada Professora!

À Prof^a Dr^a Maria Cláudia Irigoyen e aos técnicos do Laboratório de Experimental pela preciosa contribuição ao meu trabalho.

À Prof^a Dr^a Silvia Lacchini, minha eterna gratidão pela sua confiança e boa vontade, que possibilitou meu aprendizado na técnica de Imunohistoquímica em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Esper Georges Kállas que contribuiu de maneira inestimável com embasamento teórico no campo da imunologia e na elaboração dos experimentos em seu laboratório pelo método de Citometria de Fluxo.

Ao Prof. Dr. Francisco Laurindo visto que em seu laboratório aprendi a realizar a análise e quantificação das lâminas de Imunohistoquímica.

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil, que contribuiu com valiosas orientações na área da imunologia e com estímulo providencial para que eu continuasse meu projeto.

Ao Prof. Dr. Rui Curi que muitas vezes nos atendeu com apreço e generosidade ofertando-nos enorme contribuição para realização do teste ELISA.

Ao Prof. Dr. Antonio Seguro pelas orientações e contribuição na análise do NFkB pela imunohistoquímica.

À Dr^a Prof^a Enfermeira Grazia M Guerra, pelas orientações e conselhos que foram essenciais para construção deste trabalho.

Meu carinho e agradecimento a Dra. Susan Ribeiro que contribuiu de forma expressiva não só na realização e análises de Citometria de Fluxo, mas ajudou-me com orientações valiosas, enriquecendo meu conhecimento na área da Imunologia.

À minha querida amiga Silvia Beatriz Cavasin, fonte de bom senso e equilíbrio nos meus momentos mais difíceis.

Aos amigos que sempre estiveram ao meu lado tornando minha jornada mais suave diante do árduo trabalho a ser desenvolvido, em especial a Suellen, Josiane, Alcione, Thaís, Katia, Leandro, Edson, Cristiano, Otávio, Gizele, Maria Carolina, Rildo.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

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 Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Inflamação como componente das SCAs	3
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1	Síndrome coronariana aguda e inflamação	7
2.1.1	Isquemia reversível	10
2.1.2	Isquemia irreversível	11
2.2	Resposta imune inata pós isquemia miocárdica	13
2.3	Resposta imune adaptativa pós isquemia miocárdica	15
2.4	Via anti-inflamatória colinérgica	19
2.5	Estimulação colinérgica com piridostigmina	24
2.6	Justificativa e hipótese do estudo	25
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo Geral.....	28
3.2	Objetivos Específicos.....	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1	Animais	31
4.2	Sequência experimental	32
4.3	Modelo experimental de IAM e canulação da artéria femoral	33
4.4	Análise da variabilidade da frequência cardíaca.....	35
4.5	Avaliação da área infartada por ecocardiografia.....	36
4.6	Coleta de sangue e tecidos e eutanásia do animal	38
4.7	Dosagem de citocinas pelo teste ELISA	39
4.8	Avaliação de Linfócitos CD4 e CD8 em área de infarto pela Imunohistoquímica.....	39
4.9	Dosagem de Linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ em área de infarto pela Citometria de Fluxo.....	41
4.10	Análise estatística.....	41

5	RESULTADOS	42
5.1	Parâmetros hemodinâmicos, variabilidade da FC e variabilidade da PAS.....	43
5.2	Análise de parâmetros ecocardiográficos	47
5.3	Quantificação de citocinas pelo método ELISA	49
5.4	Quantificação da ativação de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ e Foxp3 ⁺ pela citometria de fluxo.....	50
5.5	Quantificação de células CD4 e CD8 no coração pela imunohistoquímica	56
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÃO	77
8	ANEXOS	79
8.1	ANEXO A: Teste ELISA.....	80
8.2	ANEXO B: Técnica de Citometria de fluxo.....	81
8.3	ANEXO C: Técnica de Imunohistoquímica	86
8.4	ANEXO D: Painel de Citometria de fluxo com especificação de anticorpos utilizados	88
8.5	ANEXO E: Tabela completa de marcadores de atividade de Linfócitos T CD4 ⁺ no sangue e no baço.....	89
8.6	ANEXO F: Tabela completa de marcadores de atividade de Linfócitos T CD8 ⁺ no sangue e no baço.....	90
9	REFERÊNCIAS	91

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI:	Área infartada
APC:	Aloficocianina
API:	Área peri-infarto
ATP:	Adenosina Trifosfato
BAFF:	Fator de ativação das células B
BSA:	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Ca:	íon cálcio
CCR5:	Quimiocinas da família CC
DAC:	Doença Arterial Coronariana
DAB:	Tetrahydrocloroeto de diaminobenzedina
DAMPs:	<i>Associated molecular patterns</i>
ELISA:	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ER:	Retículo endoplasmático
ERox:	Espécies reativas de oxigênio
FACS:	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FC:	Frequência cardíaca
FITC:	Isotiocianato de Fluoresceína
Foxp-3:	Fator de transcrição Foxp-3
FSC:	<i>Forward Scatter</i>
HF:	Alta frequência
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrogênio
HMGB:	<i>High-mobility group protein B1</i>
IAM:	Infarto Agudo do Miocárdio
ICB/USP:	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

IECA:	Inibidor da enzima de conversão de angiotensina
IFN:	Interferon
IL:	interleucina
JAK2:	<i>Janus Kinase 2</i>
LF:	Baixa frequência
LVEDP:	Pressão diastólica final de ventrículo esquerdo
MEC:	Matrix extra celular
MHC:	Complexo de histocompatibilidade principal
MMP:	Matrix metaloproteinases
MPO:	Mieloperoxidase
mRNA:	RNA mensageiro
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NFkB:	Fator de transcrição nuclear kB
NO:	Óxido nítrico
OH [·] :	Radical Hidroxil
PA:	Pressão arterial
PBS:	Tampão fosfato salina
PCR:	Proteína C reativa
PE:	Ficoeritrina
PE-Cy5:	Phycoerythrin cyanin 5
PercP:	Proteína Clorofila- Peridina
RMSSD:	Raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças entre os sucessivos valores de intervalo de pulso
ROS:	espécies reativas de oxigênio
RPM:	Rotações por minuto
RPMI:	meio de cultura para esplenócitos

RT1B:	marcadores de moléculas apresentadoras de antígenos da classe MHCII
RT-PCR:	Transcriptase reversa – Reação de polimerase em cadeia
RRV:	Variabilidade RR
RVSP:	Pressão sistólica de ventrículo direito
SCAs:	Síndromes Coronarianas Agudas
SDNN:	Desvio padrão de valores sucessivos
SNA:	Sistema nervoso autônomo
SNC:	Sistema nervoso central
SSC:	<i>Side Scatter</i>
STAT3:	Fator de transcrição STAT3
TBS:	Tampão com caseína e trizima
TLRs:	receptores Toll-like
TNF α :	Fator de Necrose Tumoral α
Tregs:	Linfócitos T reguladores
TRIV:	Tempo de relaxamento isovolumétrico
VARPAS:	variabilidade da pressão arterial sistólica
VE:	Ventrículo esquerdo
VFC:	Variabilidade da frequência cardíaca

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Neuro modulação: Reflexo inflamatório.....	21
Figura 2 -	Interação entre via anti-inflamatória colinérgica e sistema retículo endotelial.....	22
Figura 3 -	Mecanismo de ação da via anti-inflamatória colinérgica.....	23
Figura 4 -	Sequência do experimento.....	32
Figura 5 -	Indução do infarto do miocárdio em rato Wistar.....	34
Figura 6 -	Valores de Pressão arterial sistólica (A), Variância da PAS (B), Frequência cardíaca (C) e SDNN (D) no grupo controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP).....	46
Figura 7 -	Avaliação ecocardiográfica de fração de ejeção (A), área de infarto (hipocinesia/acinesia) (B) e tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) no grupo controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP).....	48
Figura 8 -	Gráficos de dosagem de IL1 (A), IL 6 (B) e TNF α (C) em tecido cardíaco no grupo controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP)....	49
Figura 9 -	Concentração de CD4 ⁺ CD25 ⁺ total (A), CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁻ (B) e CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (C) no sangue periférico e CD4 ⁺ CD25 ⁺ total (D), CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁻ (E) e CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (F) no baço de animais do grupo controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP).....	52
Figura 10 -	Concentração de CD8 ⁺ CD25 ⁺ total (A), CD8 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁻ (B) e CD8 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (C) no sangue periférico e CD8 ⁺ CD25 ⁺ total (D), CD8 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁻ (E) e CD8 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (F) no baço de animais do grupo controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP).....	54
Figura 11 -	Representação gráfica da concentração de Linfócitos T CD4 em área infartada (AI) e área peri-infarto (API).....	57

Figura 12 -	Análise Imunohistoquímica da expressão de Linfócitos T CD4 do grupo controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP) em área infartada (AI) e área peri-infarto (API).....	58
Figura 13 -	Representação gráfica da concentração de Linfócitos T CD8 em área infartada (AI) e área peri-infarto (API).....	59
Figura 14 -	Análise Imunohistoquímica da expressão de Linfócitos T CD8 do grupo controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP) em área infartada (AI) e área peri-infarto (API).....	60
Figura 15 -	Fluxo de amostra do citômetro de fluxo	81
Figura 16 -	Parâmetros identificados pela citometria de fluxo	82
Figura 17 -	Esquema gráfico da leitura de amostra marcada no citômetro de Fluxo	82
Figura 18 -	Identificação de Linfócitos CD4 ⁺ ativados em amostras de baço e de sangue pelo FACS e analisados pelo software Flo Jo.....	83
Figura 19 -	Método indireto de Imunohistoquímica pelo complexo Avidina-Biotina-Peroxidase	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Índices de variabilidade no domínio do tempo, valores absolutos e relativos das potências das bandas de baixa (LF) e de alta frequência (HF) do intervalo de pulso e pressão arterial sistólica, no grupo controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e Infartado tratado com piridostigmina (IP).....	45
Tabela 2 - Parâmetros hemodinâmicos e de ecocardiografia, no grupo controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP).....	47
Tabela 3 - Quantificação de citocinas em tecido cardíaco, no grupo controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP).....	49
Tabela 4 - Valores percentuais da expressão de marcadores de atividade de Linfócitos T CD4+ no sangue e baço no grupo controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP).....	51
Tabela 5 - Valores percentuais da expressão de marcadores de atividade de Linfócitos T CD8+ no sangue e baço no grupo controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP).....	53
Tabela 6 - Percentagem de linfócitos T CD4 em área infartada (AI), área peri-infarto (API) e área total no grupo controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP).....	56
Tabela 7 - Percentagem de linfócitos T CD8 em área infartada (AI), área peri-infarto (API) e área total no grupo controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP).....	59
Tabela 8 - Tabela completa de valores percentuais da expressão de marcadores de atividade de Linfócitos T CD4+ no sangue e no baço do grupo controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP)....	89
Tabela 9 - Tabela completa de valores percentuais da expressão de marcadores de atividade de Linfócitos T CD8+ no sangue e no baço do grupo controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP)....	90

RESUMO

Rocha JA. *Interação da atividade autonômica e resposta imunomoduladora na fase aguda do infarto do miocárdio experimental* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: A atuação do sistema nervoso parassimpático em células imunes é conhecida como “Via Anti-inflamatória Colinérgica”. Trabalhos prévios demonstraram que a estimulação vagal reduz a inflamação e melhora a sobrevivência em modelos experimentais com sepse. Neste estudo avaliamos se o uso do anticolinesterásico piridostigmina: altera o número de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) convencionais (CD25⁺Foxp3⁻) e reguladores (CD25⁺Foxp3⁺) no sangue periférico, no baço e no miocárdio; modifica a concentração de citocinas (interleucina 1, interleucina 6, TNF α) no miocárdio; e influencia a função ventricular após infarto agudo do miocárdio experimental (IAM) em ratos. **MÉTODOS:** Utilizamos ratos machos adultos da linhagem Wistar, com peso variando entre 200 e 250 g, divididos em 3 grupos de 20 animais cada: grupo controle (GC), grupo infartado sem tratamento (IC) e grupo infartado tratado com piridostigmina (IP). O infarto agudo do miocárdio (IAM) foi obtido com a técnica da ligadura da artéria coronária esquerda, e o grupo IP recebeu piridostigmina na dose de 40mg/kg/dia na água de beber, iniciada 4 dias antes do IAM. Todos os animais foram submetidos à canulação da artéria femoral no dia seguinte ao IAM para registro das curvas de pressão arterial, e posterior análise dos componentes da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), domínio do tempo (SDNN e RMSSD) e da frequência (componentes LF e HF); o estudo ecocardiográfico foi realizado no segundo dia pós IAM. No terceiro dia pós IAM, os ratos foram divididos em subgrupos de 10 animais, e sacrificados de forma específica para coleta de materiais: 500 μ l de sangue periférico e baço fresco para realização da técnica de citometria de fluxo; ventrículo esquerdo para dosagem de citocinas pela técnica de ELISA; e ventrículo esquerdo para realização de imunohistoquímica. Foram usadas as técnicas padronizadas e de uso corrente nos laboratórios. Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) multifatorial, usando o programa GraphPad Prism com teste post hoc de Tukey. **RESULTADOS:** O grupo IC comparado ao grupo controle apresentou queda significativa da pressão arterial e aumento da frequência cardíaca. O grupo IP, comparado ao grupo IC, apresentou maior atividade vagal, caracterizada pela significativa redução da FC e aumento da VFC (SDNN, 9,2 \pm 1,5 vs 5,2 \pm 0,5 p<0,05). Os parâmetros ecocardiográficos avaliados evidenciaram presença de área hipo/acinética e redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo nos grupos infartados, de igual magnitude. Com relação ao número de linfócitos T, verificamos que o grupo IC, comparado ao grupo controle, apresentou número significativamente menor de linfócitos reguladores (CD25⁺Foxp3⁺) no sangue periférico (CD4⁺: 63,5 \pm 1,4 vs 70,6 \pm 3,2%, e CD8⁺: 68,3 \pm 1,9 vs 76,1 \pm 2,8%). O grupo IP, comparado ao grupo IC, apresentou significativa redução do número de linfócitos T convencionais no sangue periférico (respectivamente, CD4⁺: 1,5 \pm 0,2 vs 2,2 \pm 0,2 %; CD8⁺: 1,1 \pm 0,1 vs 1,8 \pm 0,9 %), e no baço houve redução somente do tipo CD4⁺ (respectivamente, 1,4 \pm 0,2 vs 2,2 \pm 0,2%), com aumento do tipo CD8⁺ (respectivamente, 1,2 \pm 0,1

vs $0,7 \pm 0,1$ %). O grupo IP também apresentou significativo aumento de linfócitos reguladores ($CD25^+Foxp3^+$) no sangue periférico (respectivamente, $CD4^+$: $76,5 \pm 2,9$ vs $63,5 \pm 1,4$ %; $CD8^+$: $75,1 \pm 1,0$ vs $68,3 \pm 1,9$ %), e não apresentou diferenças significativas no número dessas células no baço. O grupo IC comparado ao grupo controle apresentou significativa marcação de anticorpos para CD4 e CD8 nas áreas infartada e peri-infarto por meio da análise de imunohistoquímica. O grupo IP comparado ao grupo IC, apresentou significativo aumento de $CD4^+$ (respectivamente, $20,9 \pm 6,5$ vs $12,2 \pm 2,5$, $p < 0,05$) e de $CD8^+$ (respectivamente, $17,9 \pm 2,8$ vs $5,8 \pm 1,1$ %, $p < 0,05$) na área infartada; observamos redução significativa na marcação de $CD4^+$ (respectivamente, $6,0 \pm 1,2$ vs $12,5 \pm 4,8$) na área peri-infarto, sem alterações significativas na marcação de $CD8^+$. **CONCLUSÃO:** O tratamento com piridostigmina em ratos com IAM está associado a aumento da atividade vagal, aumento do número de linfócitos reguladores ($CD25^+Foxp3^+$) no sangue periférico e maior mobilização de células inflamatórias ($CD4^+$ e $CD8^+$) para a área infartada no miocárdio, com redução de $CD4^+$ na área peri-infarto, no entanto sem mudança de $CD8^+$ nesta região. A mudança do perfil inflamatório decorrente do aumento da atividade vagal na fase aguda do IAM, pode ser um possível mecanismo para explicar os benefícios detectados no remodelamento cardíaco após o IAM, em especial, na redução da área de lesão e na melhora da função ventricular, com uso de anticolinesterásicos.

Descritores: Infarto do Miocárdio; Estimulação nervo vago; Linfócitos-T; Neuroimunomodulação; Piridostigmina; Via Anti-inflamatória Colinérgica

SUMMARY

Rocha JA. *Interaction of autonomic activity and immunomodulatory response in acute experimental myocardial infarction* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

INTRODUCTION: The role of the parasympathetic nervous system in immune cells is known as "Cholinergic anti-inflammatory pathway". In previous work has demonstrated that vagal stimulation reduces inflammation and improves survival in experimental sepsis models. The aim of the present study evaluated the use of anticholinesterase pyridostigmine: change the number of T lymphocytes (CD4⁺ and CD8⁺) conventional (CD25⁺Foxp3⁻) and regulatory (CD25⁺Foxp3⁺) in peripheral blood, spleen, and myocardium: modifies the concentration of cytokines (interleukin-1, interleukin-6, TNF α) in the myocardium, and influences ventricular function after experimental myocardial infarction (MI) in rats. **METHODS:** Adult male rats of Wistar strain, weighing between 200 and 250 g were divided into 3 groups of 20 animals each: control group (GC); untreated group without treatment (IC) and infarcted group treated with pyridostigmine (IP). Acute myocardial infarction (AMI) was obtained with the technique of ligation of the left coronary artery, and the IP group received pyridostigmine dose of 40 mg/Kg/day in drinking water starting 4 days before the AMI. All animals underwent cannulation of the femoral artery on the day following AMI to record the blood pressure curves, and subsequent analysis of the components of heart rate variability (HRV), the time domain (SDNN and RMSSD) and frequency (components LF and HF), the echocardiographic study was performed on the second day after AMI. On the third day post-MI, mice were divided into subgroups of 10 animals, and were sacrificed in order to collect specific materials: 500 μ l of fresh peripheral blood and spleen technique for performing flow cytometry left ventricle for measurement of cytokine ELISA, and the left ventricle to perform immunohistochemistry. Techniques used were standardized and commonly used in laboratories. The results were evaluated by analysis of variance (ANOVA) multifactorial, using the GraphPad Prism with Tukey post hoc test. **RESULTS:** The HF group compared to the control group showed a significant drop in blood pressure and increased heart rate. The IP group compared to the IC group showed higher vagal activity, characterized by a significant reduction in HR and increase HVR (SDNN, 9.2 ± 1.5 vs 5.2 ± 0.5 , $p < 0.05$). The echocardiography parameters evaluated showed presence of area hypo/acinetic and reduced ejection fraction of the left ventricle in infarcted groups of equal magnitude. Regarding the number of T lymphocytes, we found that the IC group compared with the control group showed significantly fewer lymphocytes regulators (CD25⁺Foxp3⁺) in peripheral blood (CD4⁺: 63.5 ± 1.4 vs $70.6 \pm 3.2\%$ and CD8⁺ cells: 68.3 ± 1.9 vs $76.1 \pm 2.8\%$). The IP group compared to the IC group showed a significant reduction in the number of conventional T lymphocytes in peripheral blood (CD4⁺: 1.5 ± 0.2 vs $2.2 \pm 0.2\%$; CD8⁺: 1.1 ± 0.1 vs $1.8 \pm 0.9\%$) and was reduced only in the spleen of the type CD4⁺ (1.4 ± 0.2 vs $2.2 \pm 0.2\%$) with increased CD8⁺ (1.2 ± 0.1 vs $0.7 \pm 0.1\%$). The IP group also showed a significant increase of lymphocytes regulators (CD25⁺Foxp3⁺) in peripheral blood (CD4⁺: 76.5 ± 2.9 vs $63.5 \pm 1.4\%$; CD8⁺: 75.1 ± 1.0 vs $68.3 \pm 1.9\%$), and no significant differences in the

number of these cells in the spleen. The IC group compared to the control group showed significant labeling antibodies to CD4 and CD8 areas infarcted and peri-infarction by immunohistochemical analysis. The IP group compared to the IC group showed a significant increase in CD4 (20.9 ± 6.5 vs 12.2 ± 2.5 , $p < 0.05$) and CD8 (17.9 ± 2.8 vs $5.8 \pm 1.1\%$, $p < 0.05$) in the infarcted area, and we observed a significant reduction in the labeling of CD4 (6.0 ± 1.2 vs 12.5 ± 4.8) in the peri-infarction without significant changes in the marking of CD8. CONCLUSION: The treatment with pyridostigmine in rats with acute myocardial infarction is associated with increased vagal activity, increased number of regulatory lymphocytes (CD25⁺Foxp3⁺) in peripheral blood and increased mobilization of inflammatory cells (CD4 and CD8) to the infarcted myocardium, with reduction of these cells in the peri-infarction. The change of the inflammatory profile due to increased vagal activity may be a possible mechanism to explain the benefits in the evolution of myocardial infarction, especially in the improvement of cardiac remodeling and maintenance of ventricular function with anticholinesterase drugs.

Descriptors: Myocardial infarction; T-lymphocytes; Neuroimmunomodulation; Vagal nerve stimulation; pyridostigmine; Cholinergic Anti-inflammatory Pathway.

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares de origem aterosclerótica são atualmente as principais causas de morte e invalidez no Brasil e no mundo, com destaque para as doenças coronárias.¹ Na Europa estima-se que existam por volta de oito milhões de indivíduos com angina do peito; nos Estados Unidos, esse número está em torno de doze milhões, com incidência anual de 150 mil novos casos.² A Doença Arterial Coronariana (DAC) tem um amplo espectro de apresentações clínicas, mas, seguramente, as que mais despertam interesse são as Síndromes Coronarianas Agudas (SCAs), ou seja, a angina instável e o infarto agudo do miocárdio. Esse fato é perfeitamente compreensível, pois as SCAs se associam a índices elevados de morbidade e mortalidade.² Dados referentes a 2008 estimam uma mortalidade anual de aproximadamente 7 milhões de indivíduos por DAC no mundo, por isso esta patologia é considerada a maior causa universal de morte.² Cerca de 40% dos pacientes esperam quatro horas ou mais, antes de procurar socorro e significativo número de pacientes não chega ao hospital antes das 12 horas.² Tem-se demonstrado que 50% das mortes por infarto agudo do miocárdio ainda ocorrem na primeira hora e talvez 80% nas primeiras 24 horas.²

No Brasil, dados epidemiológicos mostram que em 1930 as doenças do aparelho circulatório representavam somente 12% das mortes da população e em 2003 já respondiam por cerca de 31% dos óbitos.³ Mais recentemente (2008), houve 318 mil mortes (152 mil mulheres e 166 mil

homens) por doenças do aparelho circulatório no país, das quais quase 75 mil por ocorrência de IAM, com cerca de um milhão e cem mil internações devido a estas doenças, perfazendo gastos totais em torno de um bilhão e seiscentos milhões de reais.¹ Assim, as doenças coronarianas têm um grande impacto financeiro sobre o sistema de saúde, constituindo-se em cerca de 5% dos gastos com internação.⁴

1.1 A INFLAMAÇÃO COMO COMPONENTE CENTRAL DAS SCAS

O processo inflamatório não apenas promove o início e evolução do ateroma, mas também contribui decisivamente para a precipitação das complicações trombóticas agudas. A inflamação produz uma cascata de eventos que desencadeia a infiltração de células imunes, ativação e adesão de plaquetas e ruptura da placa de ateroma, com oclusão arterial intermitente, levando a angina instável ou infarto do miocárdio.⁵⁻¹¹ Dessa forma, a DAC pode ser considerada como uma interação entre a obstrução luminal e a inflamação intramural.

Como em todo processo de agressão ao organismo, a injúria isquêmica do miocárdio desencadeia uma série complexa de reações imunológicas visando a reparação do tecido lesado.¹² A resposta inflamatória aguda inicia-se entre 12 e 16 horas após a isquemia miocárdica, e é mediada por componentes da imunidade inata. Inicialmente, neutrófilos migram para a área infartada envolvendo e removendo os cardiomiócitos

mortos; a seguir, são recrutados macrófagos e linfócitos, que auxiliam os granulócitos na limpeza das células debrís, preparando a área para a cicatrização.¹³ A resposta inflamatória inicial pode ser amplificada, pela participação de elementos da resposta inflamatória celular e humoral que são mobilizados por citocinas produzidas por diferentes grupos celulares.¹³ Foi demonstrado que, em consequência de sua destruição, as células cardíacas liberam antígenos constituintes (proteínas contráteis cardíacas, como miosina e actina), que se tornam os principais substratos para a formação de complexos antigênicos, que irão ativar linfócitos T (resposta celular) e estimular a produção de anticorpos (resposta humoral), importantes elementos do processo de reparação pós isquêmica.¹⁴⁻¹⁸ Vários estudos demonstram que o pior remodelamento ventricular pós infarto do miocárdio está diretamente relacionado com os níveis de marcadores inflamatórios liberados tais como PCR, TNF α e IL-6, assim como com a agressividade da resposta imune global.^{19,20} Na última década, inúmeros trabalhos de Tracey e cols. têm elucidado a interação do Sistema Nervoso Autônomo e o Sistema Imunológico. A atuação do sistema nervoso parassimpático em células imunológicas vem sendo denominada “via anti-inflamatória colinérgica”.^{21,22,144} De forma breve, a ativação parassimpática utiliza o neurotransmissor acetilcolina para agir em um receptor específico, alfa 7 nicotínico, localizado em células inflamatórias.¹⁶ Intervenções que aumentam a atividade do nervo vago (estimulação elétrica ou por drogas) ou que aumentam a atividade da acetilcolina (uso de anticolinesterásicos) podem exercer um efeito imunossupressor, inibindo a síntese de citocinas

pró-inflamatórias em diferentes modelos experimentais de sepse^{21-25,27,29,59,91,117,156} e inflamação asséptica.^{28,30} Entretanto, somente recentemente tem-se avaliado a participação da neuromodulação sobre o remodelamento cardiovascular.^{32-36,75}

Em estudo prévio de nosso grupo, demonstramos o impacto positivo desta droga sobre os aspectos morfofuncionais cardíacos em ratos infartados.³⁷ Fizemos a hipótese de que esses resultados satisfatórios estão vinculados a atuação da piridostigmina no processo inflamatório da fase aguda do IAM. Nesse sentido, e com o intuito de avançar nessa área do conhecimento, o presente trabalho visa testar a hipótese de que a administração de brometo de piridostigmina é capaz de modular a resposta inflamatória que se segue ao IAM, e assim influenciar de maneira positiva o remodelamento cardíaco, de forma a proteger a função do órgão.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SÍNDROME CORONARIANA AGUDA E INFLAMAÇÃO

O endotélio pode ter influência direta no curso evolutivo e prognóstico das SCAs. Quando em disfunção, o endotélio facilita o desenvolvimento de processos inflamatórios no interior da placa aterosclerótica, provavelmente pela transcrição de genes pró-inflamatórios estimulada pela via do fator nuclear kapa B.³⁸ Esta inflamação intraplaca induz a síntese de potentes metaloproteinases por macrófagos ativados na região subendotelial promovendo a proteólise da capa externa fibrosa, principal componente de estabilização da placa.³⁹ O adelgaçamento da placa e a vasoconstrição paradoxal associada ao endotélio doente, podem predispor a placa a sua instabilização e precipitar o aparecimento das SCAs.^{5,40}

Em resposta à isquemia, as células endoteliais dos vasos localizados na área de risco do miocárdio, entram em estado de hiperatividade caracterizado por: exagerada produção de ROS, de citocinas inflamatórias, e de moléculas de adesão; e comprometimento das membranas intercelulares, com disfunção da barreira endotelial e aumento da permeabilidade.⁴¹ Estas alterações promovem e facilitam a migração de leucócitos e outras células inflamatórias para dentro do tecido miocárdico lesado.⁴² A célula endotelial também está capacitada a exercer uma função básica da resposta imune que é a apresentação de antígenos.^{43,89} Ela pode então, interagir com os linfócitos T CD4⁺, que participam do processo produzindo citocinas,

recrutando mais células, expandindo a resposta imune e migrando para o interior do tecido. A resposta inflamatória desencadeada pela lesão do endotélio, mediada principalmente por monócitos e linfócitos T no tecido, inicialmente protetora, pode se perpetuar, com recrutamento contínuo de novas células através da liberação de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas líticas, indução de moléculas de adesão, migração de células musculares lisas e formação de tecido fibrótico.^{5,44}

A presença de neutrófilos e macrófagos no sítio da injúria aumenta da lesão das células endoteliais, de forma direta e mediada por proteases e pela produção de diferentes citocinas.⁴⁵ Dentre várias citocinas envolvidas no IAM, podemos destacar: IL-1 β , IL-6, TNF α .

Em modelos experimentais de ratos, observou-se que, 6 horas após a oclusão da artéria descendente anterior, há um aumento pronunciado na expressão de mRNA de IL-1 β e IL-6 na área infartada, e também na região não infartada. Essa expressão continua aumentando até 12h após oclusão, e depois declina rapidamente, não sendo detectado aumento significativo a partir do terceiro dia.⁴⁶ Nesse mesmo estudo, ocorreu também um aumento significativo na expressão de mRNA de TNF α em área infartada e não infartada, chegando a incremento máximo ao redor do primeiro dia pós isquemia.⁴⁶ A citocina TNF α facilita a mobilização do NF-kB para dentro do núcleo celular propiciando, dessa forma, a produção de outras citocinas pró-inflamatórias.^{19,20} Isso ocorre nas células endoteliais, levando à disfunção endotelial, bem como ativação das células imunes, tendo como consequência, a amplificação da cascata inflamatória de maneira autócrina e

parácrina, resultando em um círculo inflamatório vicioso.⁴⁷ Nesse contexto, durante o processo de injúria por isquemia/reperfusão, o TNF α contribui não apenas na injúria reversível, tais como disfunção endotelial e disfunção de contração miocárdica, mas também na injúria irreversível, como no infarto do miocárdio.⁴⁸

A IL-6 não é produzida apenas pelas células imunes e células imunes acessórias incluindo monócitos e macrófagos, mas também pelas células endoteliais, células da musculatura lisa vascular e cardiomiócitos isquêmicos.⁴⁹ O aumento dos níveis de IL-6 durante o processo de isquemia-reperfusão correlaciona-se com diminuição da contratilidade cardíaca, queda da fração de ejeção, redução da capacidade funcional, e pior prognóstico.^{49,50} A IL-6 e IL-1 β atuam sinergicamente promovendo a reabsorção de tecido necrótico, remodelamento da matrix e cicatrização. Além disso, elas podem estar envolvidas na indução precoce de fibrose e hipertrofia cardíaca compensatória do miocárdio não infartado; no entanto, parecem não exercer função importante a longo prazo no remodelamento cardíaco.⁴⁶

Ainda que o intenso processo inflamatório ocorra no miocárdio, é possível detectar aumento de mediadores inflamatórios no sangue periférico. Vários estudos têm documentado a resposta inflamatória sistêmica ocorre em pacientes com IAM: há um estímulo para a expressão de IL-1, IL-6 e TNF α em leucócitos;⁵¹⁻⁵³ observa-se níveis elevados de TNF α , que parece ser um importante indicador da severidade do IAM e da ocorrência de Insuficiência Cardíaca.⁵⁴

2.1.1 Isquemia reversível

Durante a evolução da isquemia miocárdica prolongada, o processo de reperfusão é um requisito primordial para salvar os cardiomiócitos, e uma terapia de reperfusão precoce é certamente a mais efetiva estratégia para reduzir o tamanho da lesão em pacientes com infarto agudo do miocárdio.⁵⁵ A restauração do fluxo sanguíneo, contudo, desencadeia uma série de eventos que eventualmente culmina em aceleração da apoptose, da qual pode paradoxalmente reduzir os efeitos benéficos da terapia de reperfusão.⁵⁶ A reperfusão miocárdica produz lesão tecidual imediata que envolve duas fases inter-relacionadas: uma fase precoce desencadeada pelo endotélio, e uma mais tardia, que é amplificada pelos neutrófilos.⁵⁷ O dano ao miocárdio devido a injúria por isquemia/reperfusão é primariamente causada por citocinas pró-inflamatórias tais como fator de necrose tumoral (TNF)- α ^{58,59} e espécies reativas de oxigênio (ROS).^{35,41,45} O acúmulo de neutrófilos pode estar envolvido na patogênese da apoptose de cardiomiócitos pela liberação de várias citocinas.⁶⁰ Durante ativação estes neutrófilos geram ROS, mas também secretam mieloperoxidase (MPO). A MPO é a mais abundante proteína nos leucócitos e potente oxidante envolvido na injúria tecidual e remodelamento⁶¹ e esta elevada em pacientes com IAM⁶² sendo fator de risco para mortalidade a longo prazo.⁶³ A injúria de reperfusão esta associada com uma cascata inflamatória que perpetua ainda mais os danos ao tecido cardíaco após o período de isquemia. Todo este processo leva a uma rápida ativação do fator de transcrição NF-kB, que

tem atuação em uma variedade de processos biológicos incluindo resposta imune, inflamação, proliferação e apoptose.^{45,64-67} Sob condições normais, o NF-κB é inativado pela subunidade inibitória IKappa B, mas quando há injúria tecidual, o NF-κB, pode ser ativado por várias substâncias locais, inclusive a ROS.⁶⁸ A ativação do NF-κB induz a expressão coordenada de genes de vários mediadores inflamatórios, incluindo interleucinas, citocinas e moléculas de adesão⁶⁹, responsáveis pela agregação de leucócitos no endotélio vascular.⁷⁰

2.1.2 Isquemia irreversível

A injúria celular que resulta da isquemia irreversível leva a alterações da função tecidual responsáveis pelo fenômeno chamado de remodelamento ventricular. Estresse oxidativo e inflamação celular e humoral são elementos chaves deste processo. Em camundongos, assim como em humanos, a elevação dos marcadores de inflamação durante do infarto do miocárdio é preditora do desenvolvimento de miocardiopatia isquêmica e da evolução clínica adversa.⁷¹⁻⁷⁴ O tecido miocárdico irrigado pela artéria coronária ocluída consiste de um núcleo necrótico central que expande do endocárdio para o epicárdio durante a isquemia miocárdica, cercado pela área peri-infarto com cardiomiócitos ainda isquêmicos. A reperfusão limita a progressão do núcleo necrótico central, e por outro lado dá início a eventos moleculares que causam lesão de reperfusão letal na zona peri-infarto. O núcleo necrótico, a área peri-infarto isquêmica e o miocárdio reperfundido

são fontes distintas de mediadores que podem ser reconhecidos por vias inflamatórias específicas.⁵⁶ Além das alterações locais, existe também uma resposta sistêmica que consiste de mediadores liberados do miocárdio lesado e ativação de células circulantes.⁵⁶

O processo de cicatrização após infarto agudo do miocárdio resulta de uma combinação de danos entre cardiomiócitos necróticos, desestruturação da matriz extracelular e composição do colágeno. Blankesteyn e cols.¹³ relacionaram o processo de restabelecimento cardíaco em quatro fases: de 6 horas a 4 dias ocorre a morte dos cardiomiócitos (fase 1). Uma resposta inflamatória aguda começa em 12 a 16 horas após o início da isquemia (fase 2). Neutrófilos granulócitos migram para a área infartada, atingindo um pico em 24 a 48 hs após o infarto. A principal função dos granulócitos é fagocitar e remover os cardiomiócitos mortos. Em seguida, os macrófagos e linfócitos acompanham os granulócitos para dentro da área infartada e ajudam na limpeza das células debrís. Dois ou três dias após o infarto do miocárdio, a formação de tecido de granulação inicia-se na margem da área infartada (fase 3). Finalmente, o remodelamento e cicatrização da área infartada inicia-se de 2 a 3 semanas e continua por 1 ano após o infarto do miocárdio (fase 4). A limpeza de células debrís pelos neutrófilos, monócitos e macrófagos é um componente crítico da cicatrização do infarto, no entanto, a modulação desta resposta inflamatória é importante para prevenir excessiva degradação tecidual levando à expansão do infarto e insuficiência cardíaca.⁷⁵ O desenvolvimento de insuficiência cardíaca após IAM é determinado pelo: tamanho da área necrótica; resposta cicatricial que

ocorre nos dias e semanas após o evento e o remodelamento crônico da cicatriz do infarto, região peri-infarto e não infartada do ventrículo esquerdo.^{75,76} Remodelamento é um processo crônico, mediado por mudanças estruturais progressivas em cardiomiócitos e na matrix extracelular (MEC), levando a dilatação de VE, piora da função sistólica e potencialmente o desenvolvimento de arritmias ventriculares, insuficiência cardíaca e subsequente mortalidade cardiovascular⁷⁷⁻⁷⁹ Como durante o processo IAM ocorre ativação do NF-kB que medeia um inadequado remodelamento de VE e a deterioração funcional⁸⁰, tem-se sugerido que o bloqueio da ativação do NF-kB seja uma nova abordagem para prevenir o remodelamento de VE adverso.³³

2.2 RESPOSTA IMUNE INATA PÓS-ISQUEMIA MIOCÁRDICA

A fase inicial da inflamação pós-isquêmica é caracterizada pela ativação da resposta imune inata.⁵⁶ Recentemente, trabalhos têm demonstrado que o número de leucócitos no sangue periférico, e a razão polimorfonucleares / linfócitos, nas primeiras horas de infarto tem forte valor preditivo de morte em pacientes com infarto agudo do miocárdio.⁸¹⁻⁸³ Outros estudos mostram que neutrofilia⁸⁴ e em menor extensão monocitose e linfopenia também são marcadores de prognóstico pós infarto.^{85,86} Meissner e cols.⁸⁷ relatam que o numero de polimorfonucleares é um biomarcador de prognóstico no remodelamento crônico do ventrículo esquerdo.

No IAM os macrófagos são funcionalmente heterogêneos e podem ser classificados respectivamente em M_1 e M_2 , baseados na expressão de marcadores de superfície. Os macrófagos M_1 , de primeira resposta, são predominantes no terceiro dia pós IAM e exibem altos níveis de expressão de mediadores pró-inflamatórios; os macrófagos M_2 , de resposta tardia, predominam no quinto dia pós IAM, e expressam, além de genes pró-inflamatórios, altos níveis de citocinas anti-inflamatórias IL-10 e altos níveis de genes de reparação.⁸⁸

Como parte importante do sistema imune inato, os receptores *Toll-like* (TLRs), foram descritos em 1997 por Medzhitov e cols.⁸⁹ Esses receptores de sinalização encontram-se expressos em células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas) e vários tipos de células parenquimais, incluindo os cardiomiócitos e células endoteliais. Matzinger e cols.⁹⁰, já em 2002, descreveram um modelo de imunidade (*danger model*) baseado na idéia de que o sistema imune inato responde a entidades endógenas que causam injúria, ao invés de apenas a estímulos externos. A isquemia cardíaca induz a produção de “sinais de perigo endógeno”, refletida na expressão de diversas proteínas não reconhecidas como *self*, denominadas DAMPs (*danger-associated molecular patterns*), que ativam os TLRs para iniciar uma resposta inflamatória via NF- κ B.⁵⁶ A interação DAMPs – TLRs desencadeia uma reação inflamatória, envolvendo influxo de células inflamatórias e a produção e liberação de citocinas, via translocação nuclear do NF- κ B. A inibição da sinalização dos TLR pode ser outra estratégia para modular a inflamação e melhorar a sobrevivência no IAM. Ligantes endógenos

dos TLR, descritos como sinais de perigo ou *danger-associated molecular patterns* (DAMPs), são produzidos na miocardiopatia isquêmica e promovem recrutamento e ativação de células mieloides pro-inflamatórias após IAM.⁷¹ Camundongos deficientes de TLR4 exibem uma diminuição no recrutamento de células mieloides, redução nos níveis de expressão de citocinas pró-inflamatórias e diminuição nos níveis de atividade da matrix de metaloproteinases em área infartada após IAM. Esta resposta inflamatória diminuída esta associada com atenuação do remodelamento ventricular e melhora da função sistólica.⁹²

2.3 RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA PÓS-ISQUEMIA MIOCÁRDICA

A resposta imunológica adaptativa é acionada quando a resposta imunológica inata não está sendo suficiente para a erradicação “dos antígenos”. O fator de transcrição NF-κB, além de amplificar e estender a imunidade inata pela indução de moléculas efetoras e estimular a produção de ROS, também promove uma ligação molecular entre o sistema imune inato e adaptativo. Isto envolve uma maior produção de proteínas MHC e CD80/86 em células apresentadoras de antígenos resultando em resposta mediada pelos linfócitos T, que são as principais células envolvidas na resposta adaptativa.^{93,94} A função inflamatória do fator de transcrição NF-κB persisti através da resposta imune adaptativa, ativando ambos antígenos e receptores co-estimuladores em linfócitos B e T assim como estimulando o

fator de ativação da célula B (BAFF) para induzir diferenciação e sobrevivência das células B.⁹³⁻⁹⁵

As células T CD4⁺ podem ser subdivididas em subpopulações de células helper (Th1, Th2, Th17, Treg) devido aos diferentes padrões de secreção de citocinas. Células Th1 produzem citocinas pró-inflamatórias interferon (IFN), interleucina (IL-2) e fator de necrose tumoral (TNF)- α , e são efetivas na indução de resposta imune celular pela ativação de macrófagos e início da inflamação.^{96,97} As células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, citocinas que promovem alergia e são muito efetivas para auxiliar as células B na produção de anticorpo, e, além disso, elas também suprimem a inflamação Th1 dependente.^{96,97} Em trabalho recente demonstrou-se que os subtipos de linfócitos T CD4⁺ predominantes no IAM são Th1 e células T reguladoras, portanto o subgrupo Th2 e Th17 encontram-se em menor quantidade.⁸⁸ Em pacientes com IAM uma relação elevada entre Th1/Th2 esta associada à dilatação ventricular, disfunção sistólica, e piora da classe funcional¹⁸ e é preditora de maiores eventos cardiovasculares.⁹⁸ No IAM a causa da resposta autoimune patológica pode residir em uma quebra de tolerância, devido a uma regulação deficiente de um compartimento do linfócito T.⁹⁹ Um novo componente das células T reguladoras conhecida como CD4⁺CD25⁺ Tregs é especializada na supressão de resposta imune patogênica Th1 contra antígenos próprios e não-próprios e controle da homeostase das células T.¹⁰⁰ A maioria, senão todas as células Treg são células CD4⁺ e expressam a molécula CD25 (IL-2R α). A expressão de CD25 em células Treg é crucial para a geração, sobrevivência e função dessas células.

Camundongos deficientes de IL-2 ou CD25 desenvolvem uma doença linfoproliferativa com manifestações autoimunes que pode ser revertida pela administração de IL-2 nestes animais.⁷ Estudos recentes sugerem que a expressão de um fator de transcrição Foxp3, independente da expressão de CD25 ou restrição de MHC, define naturalmente a ocorrência da linhagem de células Treg.¹⁰¹ Ao contrário de CD25, a Foxp3 é exclusivamente expressa pelas células Tregs, mas não ativada pelas células T, por isso torna-se um marcador confiável para quantificação de células Treg em sangue periférico.^{102,103} Em pacientes com DAC, o subtipo T CD4⁺CD25⁺ foram divididos em dois grupos distintos Foxp3⁺ e Foxp3⁻. As células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ foram consideradas Tregs.¹⁰⁴ A proporção de células Foxp3⁺ no total de CD4⁺CD25⁺ varia de 32.1% a 93.4%.¹⁰⁴ As células CD4⁺CD25⁺Treg estão envolvidas na manutenção da auto-tolerância e suprimem respostas imunes aberrantes ou excessivas.¹⁰⁵ As células dendríticas, células apresentadoras de antígenos profissionais, podem induzir e expandir as células Treg, sugerindo que o acúmulo de Treg depende de um estímulo periférico contínuo, talvez via apresentação de antígenos teciduais pelas células apresentadoras de antígenos residentes.¹⁰⁶ Dados da literatura sugerem que, em indivíduos com SCA, há redução e disfunção (comprometimento de sua função supressora sobre células T efetoras) do linfócito Treg CD4⁺CD25⁺ e redução da expressão de Foxp3, quando comparados com indivíduos normais e com angina estável.¹⁰⁷ A redução dos linfócitos CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ foi consistente com a expansão de células Th1 em pacientes com angina instável. A relação inversa entre

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e células Th1 deve contribuir para a instabilização da placa de aterosclerose nestes pacientes.¹⁰⁴ Em indivíduos com SCA ocorre um significativo aumento de Th17 e citocinas relacionadas e uma redução de Treg e citocinas relacionadas comparados aos indivíduos normais e com angina estável. Esta anormalidade é consequência de um desequilíbrio na relação Th17/Treg.¹⁰⁸ e pode ser explicada pelo processo de apoptose das células Treg na angina instável e infarto agudo do miocárdio.¹⁰⁹

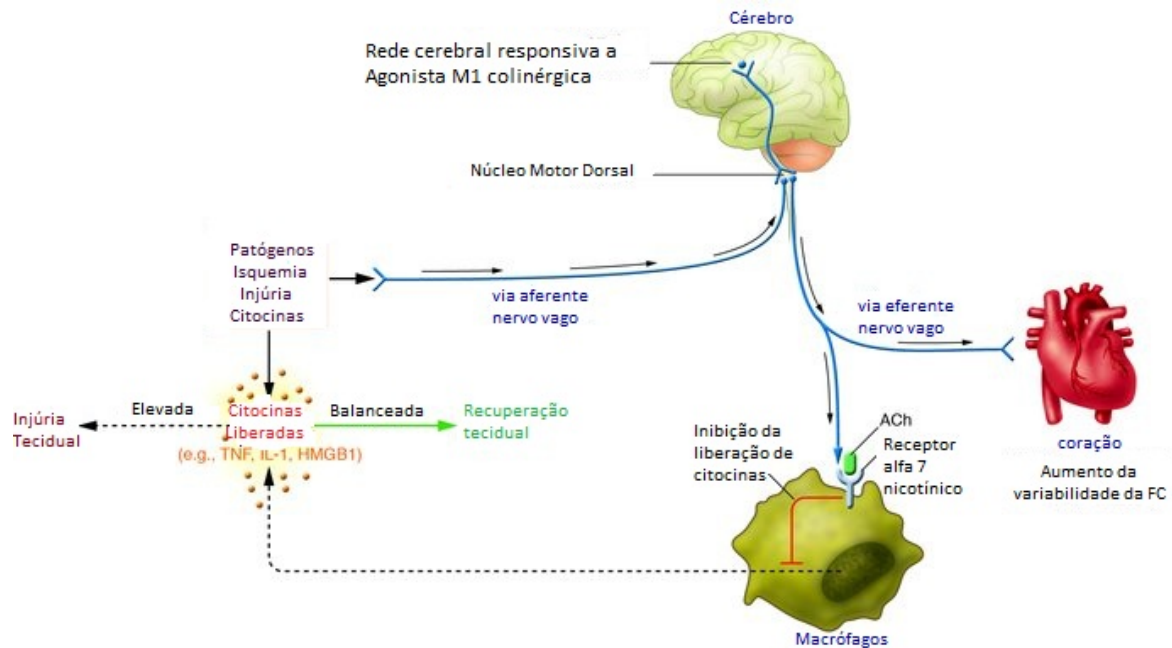
Com relação a linfócitos T CD8⁺, verificou-se que o pico de ação desta célula encontra-se no sétimo dia pós-IAM.^{88,110} Células T CD8⁺ que expressam receptores de angiotensina tipo 2 e células T reguladoras que expressam receptor de quimiocina CCR5 promovem efeitos anti-inflamatórios e sustentam a cicatrização pós IAM em camundongos. O efeito destas células pode ser, em parte, pela liberação da citocina anti-inflamatória IL-10.^{165,166} Estudo recente com camundongo mostrou que além de células CD4⁺, ocorre aumento da proliferação de células CD8⁺ no sétimo dia pós IAM. No entanto isto não ocorre em camundongo knockout de MHCII, o que sugere que as células CD4⁺ restritas da classe II do MHC são necessárias para que as células CD8⁺ tornem-se ativadas após o IAM. Em camundongos normais a ativação de células CD8⁺ mostrou-se ser importante no processo de cicatrização pós IAM, portanto a alteração na proporção de CD4⁺ e CD8⁺ em ratos knockout de MHCII ou de seus receptores, deve contribuir para o maior índice de ruptura ventricular e pior sobrevida pós infarto destes animais.¹¹⁰

A presença de auto-anticorpos contra proteínas contráteis cardíacas (miosina e actina) foi detectada em soro de pacientes com IAM, sendo estes anticorpos contra tais proteínas, considerados marcadores de resposta imune específica contra miocárdio após IAM.^{15,16,111-114} O complexo miosina cardíaca-linfócito T específico pode desencadear inflamação miocárdica e levar ao remodelamento ventricular, sugerindo que a miosina cardíaca pode ser o principal antígeno que desencadeia a resposta imune.^{17,115} Além disso, foram encontrados diferentes tipos de anticorpos cardíacos contra tropomiosina e actina em pacientes infartados durante 3 meses após o evento. Estes achados indicam que os anticorpos anti-miosina e tropomiosina cardíacas podem estar relacionados com o dano miocárdico e o desarranjo da função cardíaca, aventando que, a autoimunidade após IAM piora o remodelamento ventricular.¹⁴⁻¹⁸

2.4 VIA ANTI-INFLAMATÓRIA COLINÉRGICA

A ligação funcional entre o sistema nervoso parassimpático e o sistema imunológico foi sugerida há mais de 40 anos, quando foi descrita a atenuação da citotoxicidade do linfócito T pela estimulação colinérgica muscarínica.¹¹⁶ Entretanto, somente na última década é que estão sendo identificadas as vias de sinalização, os grupos celulares, e potenciais mediadores que conectam esses dois importantes sistemas de homeostase do organismo. Estudos realizados pelo grupo de Tracey K e cols.

contribuíram enormemente para o conhecimento nessa área.^{21,22,27,91,117,118,119,144,151} Descreveram inicialmente que a ativação do nervo vago (elétrica ou com uso de agonistas colinérgicos) reduz a resposta inflamatória em modelos experimentais de sepse; em trabalhos subsequentes, esse grupo cunhou a teoria do “Reflexo Inflamatório”. Como todo arco reflexo mediado pelo sistema nervoso, é composto por uma via de informação aferente, áreas de integração no SNC e uma efetora eferente. De forma breve, verificou-se que mediadores inflamatórios (citocinas) produzidos em tecidos periféricos “notificam” o SNC da presença de inflamação no organismo, por ação direta em áreas centrais ou por estimulação de aferências do nervo vago; nas áreas centrais ocorre a integração dos sinais e desencadeamento da resposta inflamatória global, incluindo a ativação da via eferente do parassimpático, mediado em especial, pelo nervo vago; o nervo vago, cujo neurotransmissor é acetilcolina (via colinérgica) inerva vários componentes ou órgãos do sistema imunológico (sistema retículo endotelial), como linfonodos, fígado e baço; a ativação do vago leva a redução da produção de citocinas pelo baço de forma significativa, e como consequência uma redução intensa da resposta inflamatória (em modelos de inflamação séptica e asséptica). No reflexo inflamatório, o vago é o elemento mais importante no braço eferente (Figura 1).

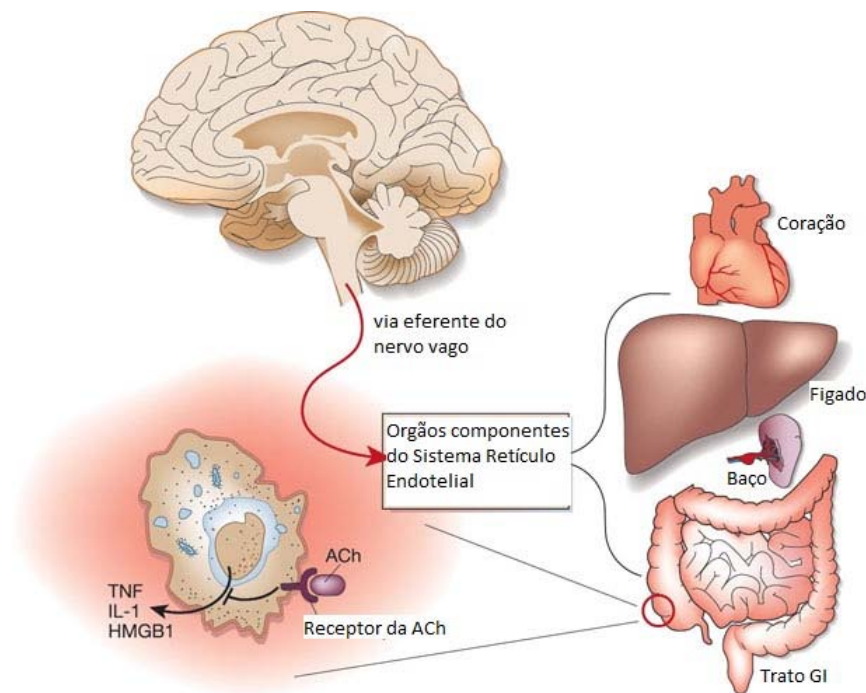


Adaptação Tracey KJ. Nature 2002

Figura 1 – Neuro modulação: Reflexo Inflamatório

Blalock e cols.¹²⁰ sugeriram que o sistema imunológico, vinculado ao sistema nervoso central, funcionaria como um “sexto sentido”, capaz de detectar a invasão microbiana e outras substâncias inflamatórias, de retransmitir estas informações ao cérebro, e de desencadear respostas que irão interferir no processo inicial.

Recentes estudos têm relacionado a hiperatividade parassimpática, obtida por meio de drogas ou pela estimulação direta do nervo vago, como mecanismo contra-regulador da liberação de citocinas e EROs durante um processo inflamatório.^{22,32} (Figura 2).



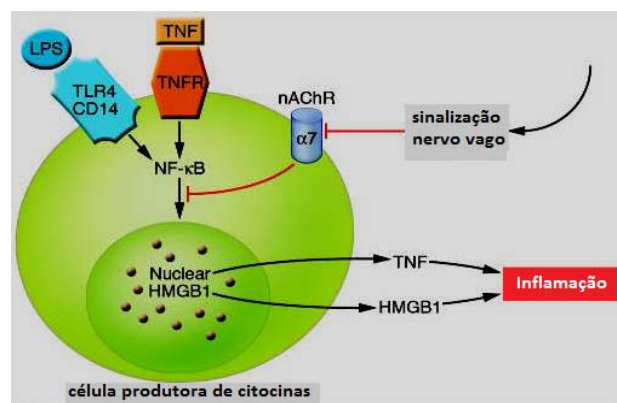
Adaptação Tracey KJ. Nature 2002

Figura 2 - Interação entre via anti-inflamatória colinérgica e sistema retículo endotelial

Dentre vias de sinalização e as células envolvidas nesse processo, descreveu-se o importante papel dos macrófagos (resposta imunológica inata). Estudos em animais indicam que o neurotransmissor liberado pelo nervo vago, a acetilcolina, é capaz de inibir a produção de citocinas pelos macrófagos localizados no baço, ligando-se aos receptores do tipo nicotínico, mais especificamente, receptores α -7 nicotínicos.

Ainda que ambos os receptores para acetilcolina, nicotínicos e muscarínicos, sejam encontrados nos macrófagos, somente os receptores α -7 nicotínicos exercem função relevante na via anti-inflamatória colinérgica.^{16,27,121} Pesquisas com camundongos knockout para o receptor alfa7 nicotínico mostraram claramente, in vivo, o importante papel dessa

subunidade na via anti-inflamatória colinérgica: esses animais são mais sensíveis a estímulos inflamatórios porque liberam maiores quantidades de TNF α , IL-1, IL-6 no sangue quando comparados com animais selvagens; não se observa significativa redução da produção de citocinas no baço e no fígado (TNF α , IL-1, IL-6, IL-8, e HMGB1) por meio da estimulação elétrica do nervo vago¹⁶; macrófagos peritoneais isolados desses animais não respondem à acetilcolina nem à nicotina, e quando estimulados, continuam a produzir TNF α mesmo na presença desses ligantes.²²



Adaptação Wang H. 2004

Figura 3 - Mecanismo de ação da via anti-inflamatória colinérgica

A ativação do receptor α -7 nicotínico desencadeia uma série de mecanismos de sinalização que em células inflamatórias exercem efeitos anti-inflamatórios diretos através da diminuição da translocação para o núcleo do fator de transcrição NF- κ B, ou indiretos através da ativação do fator transcricional STAT3, via fosforilação pela JAK2.¹²²⁻¹²⁵ O receptor de acetilcolina do subtipo α -7 nicotínico está presente em macrófagos, e

também pode ser identificado em outros importantes grupos celulares, como linfócitos e células endoteliais.^{118,126} Desta forma, o reflexo anti-inflamatório também tem importante influência na resposta imunológica adaptativa.

A importância do via anti-inflamatória colinérgica está se expandindo para modelos experimentais de doenças cardiovasculares, onde a resposta inflamatória está bem estabelecida.^{21,23,34,110,127,135,164} A estimulação colinérgica no modelo animal de injúria isquemia/reperfusão miocárdica se associou a diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF α e HMGB1³⁶ e promoveu redução da área de infarto e melhora de parâmetros funcionais do ventrículo esquerdo.^{36,37} Portanto, após a reperfusão miocárdica, a “lesão residual” mediada por aumento do estresse oxidativo e liberação de citocinas pró inflamatórias, pode ser modulada pela ativação do Sistema Nervoso Autonomo (SNA).

2.5 ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA COM PIRIDOSTIGMINA

O brometo de piridostigmina é um composto amônico quaternário que inibe a hidrólise de acetilcolina pela ligação reversível com a acetilcolinesterase, aumentando a permanência deste neuromediador na fenda sináptica. Ele é usado clinicamente no tratamento de Miastenia Gravis, assim como na profilaxia contra a intoxicação por organofosforatos¹²⁸ e como suposto tratamento para doença cardíaca.¹²⁹⁻¹³¹

Com relação as suas ações cardiovasculares, existe evidência que a piridostigmina reduz a frequência cardíaca, melhora a função diastólica ventricular e reduz a dispersão do intervalo QTc em indivíduos normais.^{130,132-134}

Em estudo prévio de nosso grupo, demonstramos que a administração de piridostigmina em ratos Wistar submetidos ao infarto do miocárdio por meio da ligadura da coronária esquerda: reduziu a área de acinesia (maior que 80%), verificada tanto pelo ecocardiograma, quanto pela histologia; e recuperou as funções sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, com normalização da pressão diastólica final e das derivadas de contração e relaxamento da cavidade. Esses efeitos foram observados em três diferentes momentos: 7, 21, e 42 dias após infarto do miocárdio.³⁷

2.6 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO ESTUDO

Considerando-se que: a resposta inflamatória é um mecanismo determinante no processo de remodelamento ventricular após IAM; uma intensa resposta inflamatória se associa a pior função ventricular pós IAM; o aumento da atividade vagal reduz a resposta inflamatória em diferentes modelos animais; novas abordagens são necessárias para prevenir o remodelamento e disfunção do miocárdio após o infarto agudo do miocárdio; fizemos a hipótese de que a estimulação parassimpática farmacológica é capaz de interferir precocemente na resposta inflamatória que se segue à

isquemia miocárdica no modelo de IAM no rato. Esse seria um dos potenciais mecanismos pelos quais ocorre a melhora da função miocárdica já descrita em estudo prévio do nosso grupo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do acetilcolinesterásico, brometo de piridostigmina, sobre a resposta inflamatória na fase aguda do infarto do miocárdio experimental em ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar em ratos submetidos à ligadura da coronária esquerda, tratados ou não com piridostigmina, no terceiro dia após o procedimento, os parâmetros abaixo discriminados:

- 1 - pressão arterial sistólica e diastólica, frequência cardíaca e variabilidade da frequência cardíaca - inferidas por meio da análise de curvas de pressão arterial registradas de forma direta (intra-arterial);
- 2 - função sistólica, diastólica, e área de hipo/acinesia do ventrículo esquerdo, obtidos por meio do exame de ecoDopplercardiografia;
- 4 - concentração de IL-1 β , IL-6 e TNF α no ventrículo esquerdo, por meio da quantificação protéica com a técnica de ELISA;

- 5 - a presença de linfócitos T, CD4⁺ e CD8⁺ no ventrículo esquerdo (área infartada e região peri-infarto), por meio da técnica de imunohistoquímica;
- 6 - número de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ativados no sangue periférico e em macerado do baço, e porcentagem dos subtipos convencionais (Foxp3⁻) e reguladores (Foxp3⁺), por meio da técnica de citometria de fluxo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para realização deste estudo foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos adultos, com peso variando entre 200 e 250 g, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina 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 de roedores. O manejo dos animais obedeceu aos princípios éticos da experimentação animal da Sociedade Brasileira da Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA).

O Estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da USP (CAPPesq) com registro de n* 0629/09 e com apoio financeiro da CNPq .

4.2 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL

Os animais foram separados em 3 grupos: 1 grupo controle e 2 grupos infartados, para cada avaliação, no terceiro dia pós infarto:

Grupo Controle (GC): animais sem tratamento e sem infarto

Grupo Infartado: animais infartados sem tratamento (**IC**) e animais infartados tratados com brometo de piridostigmina (**IP**)

O brometo de piridostigmina (Sigma) foi administrado aos animais na concentração de $0,2 \text{ mg/ml}^{-1}$ e na dose de 40 mg/Kg/dia , conforme protocolo prévio de nosso laboratório.³⁷

Conforme esquematizado na figura 4, iniciou-se o tratamento com piridostigmina quatro dias antes do infarto. A escolha deste tempo deveu-se a necessidade de evitar níveis séricos irregulares e prejuízo na ação farmacológica da droga, visto que o animal precisou ser anestesiado várias vezes para realização dos procedimentos descritos abaixo, interferindo desta forma, no nível de consciência e na ingestão de água com medicamento no período pós infarto.

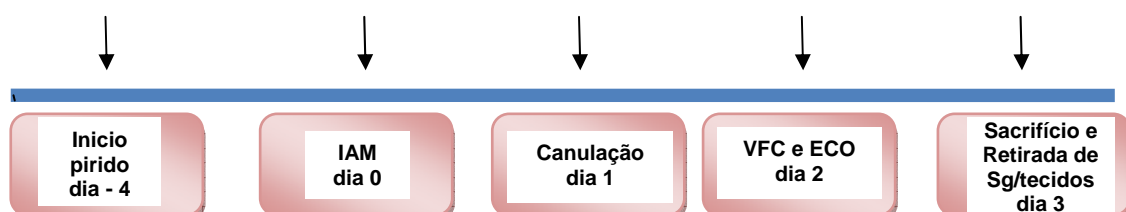


Figura 4 - Sequência do experimento

O dia do infarto foi considerado dia “0”, e a canulação da artéria femoral foi realizada no primeiro dia pós infarto (dia 1). No segundo dia (dia 2) pela manhã foram realizados os registros das curvas de pressão arterial (para posterior análise da PA e da variabilidade da frequência cardíaca) com o animal alerta e à tarde foi realizado o estudo ecocardiográfico com o animal anestesiado. No terceiro dia pós IAM (dia 3) os animais eram anestesiados e submetidos a eutanásia para retirada de sangue e tecidos, de acordo com protocolos já estabelecidos: administração de dose letal de anestésico, seguida de retirada rápida de sangue, coração e baço (o material foi utilizado para análise de citometria de fluxo e dosagem de citocinas) ou anestesia seguida de perfusão do animal com solução de cloreto de potássio (material coletado foi enviado para imunohistoquímica).

4.3 MODELO EXPERIMENTAL DE IAM E CANULAÇÃO DA ARTÉRIA FEMORAL

A indução do infarto do miocárdio foi realizada sob anestesia com ketamina (80 mg/Kg e xilazina 12 mg/Kg). Após o animal ser intubado e colocado em ventilação mecânica (Intermed, Inter 3, São Paulo, SP) foi realizada uma toracotomia esquerda no 4^o 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 da aurícula esquerda com um fio prolene 6-0 (Figura 5). A realização bem sucedida do infarto foi constatada pela observação do desenvolvimento de uma cor pálida no miocárdio distal à região da ligadura.¹³⁶

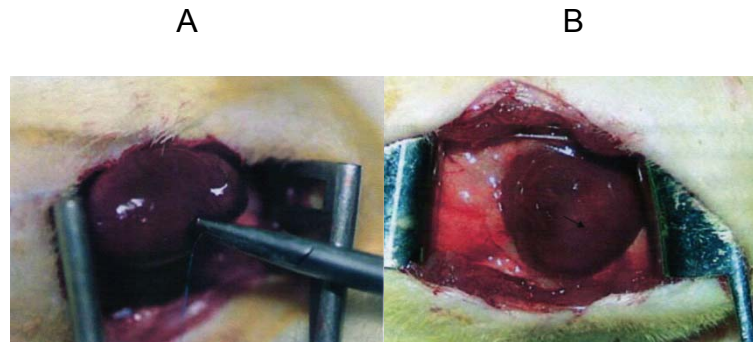


Figura 5 - Indução do Infarto do Miocárdio em rato Wistar. A: ligadura da artéria interventricular anterior, B: coloração pálida em área infartada

No primeiro dia após infarto, os animais foram submetidos à implantação cateter de polivinil em artéria femoral. Os cateteres foram confeccionados em tubo de polivinil Tygon (15 cm) tendo uma das extremidades conectada a um outro tubo de polivinil com diâmetro menor (PV – 10) e 5 cm de extensão. Os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal com Ketamina (80 mg/Kg) e Xilazina (12 mg/Kg). O animal foi colocado em decúbito dorsal e a tricotomia foi feita na região medial do membro posterior esquerdo. Após a realização da incisão, o cateter foi inserido na artéria femoral, passado subcutaneamente e exteriorizado no dorso do animal, próximo à região cervical.

4.4 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

Os valores de PA, FC e variabilidade de frequência cardíaca foram calculados com as curvas de pressão registradas no segundo dia após o IAM, com o animal acordado.

A cânula arterial foi conectada a um transdutor eletromagnético (Blood Pressure XDCR; Kent Scientific, Torrington, CT) que, por sua vez, estava conectado 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.¹³⁶

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 na análise espectral. A faixa de frequência de

interesse para análise espectral no rato encontra-se no intervalo que vai de 0 até 3Hz.^{138,139}

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 nosso tempo de coleta dos sinais de interesse para a análise espectral, esse estudo não abordou as VLF.

Os índices baseados na medida dos intervalos RR individualmente, como SDNN (desvio-padrão da média de todos os intervalos RR normais, expresso em milisegundos), representam a variabilidade global e refletem a atividade de ambos, parassimpático e simpático.¹³⁷ A variável RMSSD (raiz quadrada da média das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes, expressa em milisegundos, ou seja, o desvio-padrão das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes) reflete predominantemente a modulação vagal para o coração.

4.5 AVALIAÇÃO DA ÁREA INFARTADA POR ECOCARDIOGRAFIA

O exame ecocardiográfico foi realizado no segundo dia pós infarto para a quantificação da área infartada, avaliação da função ventricular, e seguiu as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia.¹⁴⁰ Utilizou-se o equipamento SEQUOIA 512 (ACUSON Corporation, Mountain View, CA), com transdutor de 15 MHz. As imagens foram feitas a uma em

frequência de 13,0 MHz, para otimização da resolução e a penetração do animal. Para registro das imagens foi utilizado gel de transmissão para ultrassom de viscosidade média/alta (General Imaging Gel, ATL, Reedsville, USA). As imagens foram armazenadas em CDs, em discos ópticos (Sony 128Mb) e em papel fotográfico, geradas através de impressão colorida (Sony, Color Video Printer Mavigraph UP-5600 MDU).

Os exames foram realizados por um único observador, com os animais anestesiados com uma solução de ketamina (80 mg/Kg) e xilazina (12 mg/Kg), através de injeção intra-peritoneal. 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.

Outra variável analisada pelo ecocardiograma foi o Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV). Esse índice analisa basicamente a fase de relaxamento do miocárdio, que ocorre após o pico sistólico, no período entre o fechamento da valva aórtica e a abertura da valva mitral, no qual o

ventrículo esquerdo não altera seu volume. Esse parâmetro pode ser também obtido através do modo M, assim como pelo Doppler, com a aquisição simultânea das curvas de fluxo mitral e aórtico. Usualmente, quando o relaxamento torna-se prejudicado, o TRIV está prolongado, sendo o valor normal em humanos de aproximadamente $65 + 20$ ms, com alguma variação conforme os diferentes autores.

4.6 COLETA DE SANGUE E TECIDOS E EUTANÁSIA DO ANIMAL

No terceiro dia após infarto, os animais do experimento receberam uma dose letal de anestésico Pentobarbital Sódico (90 mg/Kg). Após o animal apresentar parada respiratória era feita uma toracotomia e retirado 2 ml de sangue por punção do átrio direito (quantificação de linfócitos, por citometria de fluxo).

De alguns grupos de animais foram retirados tecidos frescos (coração e baço) e armazenados em nitrogênio líquido e posteriormente usados para quantificação protéica (ELISA). Parte do baço foi submetido a processo de digestão enzimática e homogenização mecânica para quantificação de linfócitos, por citometria de fluxo.

Outros grupos de animais foram submetidos à perfusão do coração (como descrito no Anexo C), para posterior análise de imunohistoquímica.

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

4.7 DOSAGEM DE CITOCINAS PELO TESTE ELISA

A dosagem das citocinas IL-6, IL-1 e TNF- α foi realizada em tecido cardíaco pela técnica de ELISA. Foram coletadas amostras de 2 mm da parte mediana do ventrículo esquerdo, que após a retirada, foram acondicionadas em eppendorf de 2 ml e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas em freezer (- 70 °C) até o momento da análise, que foi realizada laboratório do ICB 1 / USP. Utilizou-se o teste de ELISA já padronizado pelo laboratório para as citocinas de interesse, como descrito no anexo A.

4.8 AVALIAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4 E CD8 EM ÁREA DE INFARTO PELA IMUNOHISTOQUÍMICA

Buscou-se verificar a presença no tecido cardíaco de linfócitos CD4 e CD8 por meio da identificação de seus antígenos de superfície, utilizando anticorpos específicos marcados com substância fluorescentes. Nesse sentido, escolhemos uma lista de anticorpos para identificação de antígenos

de superfície dos linfócitos CD4 e CD8, seguindo as recomendações da literatura, e de acordo a espécie do animal.

A descrição detalhada do método, incluindo o protocolo de preparação das lâminas para realização da imunohistoquímica, está descrita no Anexo C.

Após montagem das lâminas, as mesmas foram analisadas em microscópio Leica DM 2500 acoplado ao software LEICA Q WIN V3, que quantifica a intensidade de marcação fluorescente das áreas delimitadas.

Foram padronizadas para análise três regiões do coração: a região infartada central, região subendocárdica e região subepicárdica. A região infartada era reconhecida pela presença de maior concentração de infiltrado inflamatório. Uma vez delimitada a área infartada, convencionou-se chamar de área peri-infarto, toda região limítrofe a esta área, com menor concentração de células inflamatórias, que poderia abranger a região subendocárdica e a região subepicárdica.

Foram selecionados 5 campos em cada região (infartada, subendocárdica e subepicárdica) perfazendo um total de 15 campos analisados por lâmina. A quantificação da marcação foi feita de forma automática. Apresentamos a proporção entre área de marcação específica e área total avaliada (ex: % CD4 na região = área de CD4 / área total).

4.9 DOSAGEM DE LINFÓCITOS CD4⁺ E CD8⁺ PELA CITOMETRIA DE FLUXO

Utilizamos o método de citometria de fluxo para identificar e quantificar as populações de Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ convencionais e reguladores (Tregs) presentes no sangue periférico e no baço, por meio da técnica de Separação de Célula pela Atividade de Fluorescência (FACS). Os exames foram realizados na Faculdade de Medicina da USP no LIM número 60, coordenado pelo Prof Éspér Kállas, com equipamento FACS Canto BD. Após a retirada do sangue e do baço, os tecidos foram preparados de acordo com protocolos já estabelecidos pelo laboratório de referência. A descrição detalhada dos procedimentos encontra-se no Anexo B.

Os anticorpos utilizados estão relacionados no Anexo D. Para a avaliação da porcentagem de cada marcador utilizou-se o software *Flow Jo*. Utilizamos para a apresentação dos resultados e para a análise os valores percentuais de cada subtipo de linfócito.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises das medidas descritivas e testes estatísticos, foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0 da GraphPad Software. Para as comparações entre grupos foi usada a análise de variância (ANOVA) multifatorial com teste *post hoc* de Tukey, ou teste de Kruskal-Wallis. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

5 RESULTADOS

Os resultados apresentados a seguir correspondem aos dados obtidos nas análises das diferentes fases do estudo.

5.1 PARÂMETROS HEMODINÂMICOS, VARIABILIDADE DA FC E VARIABILIDADE DA PAS

Na Tabela 1 encontram-se os parâmetros hemodinâmicos e de variabilidade da FC e da PAS. Pode-se observar que os valores médios da PAS foram significativamente menores nos grupos infartados sem tratamento (IC) e tratados com piridostigmina (IP), em comparação com o grupo controle (GC) (Figura 6 A). Com relação a frequência cardíaca, podemos observar aumento significativo no grupo IC quando comparado ao grupo GC; porém no grupo tratado (IP), a FC foi semelhante aos do grupo controle (GC), e significativamente menor que o grupo sem tratamento (IC) (Figura 6 C).

Na análise da variabilidade da FC, pode demonstrar que o SDNN aumentou de forma significativa no grupo infartado com tratamento ($9,2 \pm 1,5$, IP) comparado com os grupos controle ($5,9 \pm 1,1$, GC) e infartado sem tratamento ($5,2 \pm 0,5$, IC) (Figura 6 D). O mesmo fato foi observado com relação a variável RMSSD, porém, o aumento não alcançou significância estatística. Nos demais parâmetros, não encontramos diferenças entre os grupos.

Na análise da variabilidade da PAS, pudemos observar que o grupo infartado sem tratamento apresentou redução da VARPAS ($9,3 \pm 1,4$, IC), comparado com os grupos controle ($16,0 \pm 3,9$, GC), sendo que no grupo infartado tratado esse valor foi significativamente maior que ambos os grupos ($21,4 \pm 5,2$, IP) (Figura 6 B). Não houve diferenças significativas em outras variáveis.

Tabela 1 - Índices de variabilidade no domínio do tempo, valores absolutos e relativos das potências das bandas de baixa (LF) e de alta frequência (HF) do intervalo de pulso e pressão arterial sistólica, no grupo controle (GC), infartados sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP)

	GC (n=7)	IC (n=10)	IP (n=10)	P
Pressão Arterial Sistólica				
PAS (mmHg)	129,2± 3,0	111,1± 1,2	108,8±3,8*	p<0,05
VARPAS (mmHg ²)	16,0 ± 3,9	9,3 ± 1,4 [#]	21,4 ± 5,2	p<0,05
LF Abs (mmHg ²)	3,6 ± 0,9	2,1 ± 0,2	2,9 ± 0,9	p>0,05
Intervalo de Pulso (FC)				
FC (bpm)	355,1± 9,7	390,2± 5,3	355,6±12,7 [#]	p<0,05
SDNN (ms)	5,9 ± 1,1	5,2 ± 0,5	9,2 ± 1,5 [#]	p<0,05
RMSSD (ms)	4,9 ± 0,6	4,9 ± 0,3	5,2 ± 0,3	p>0,05
LF nu (%)	13,6 ± 2,5	16,8 ± 0,3	18,1 ± 0,8	p>0,05
HF nu (%)	86,4 ± 5,1	83,2 ± 4,1	81,9 ± 3,6*	p<0,05
LF/HF	0,1 ± 0,05	0,2 ± 0,04	0,2 ± 0,07	p>0,05

PAS: pressão arterial sistólica; VARPAS: variância da PAS; FC: frequência cardíaca; SDNN: desvio padrão de valores sucessivos; RMSSD: raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças entre os sucessivos valores de intervalo de pulso. LF nu: baixa frequência relativa; HF nu: alta frequência relativa; LF/HF: balanço autonômico. Apresentados em média dos valores ± erro padrão. *p<0,05 IP vs GC. [#]p<0,05 IP vs IC. [§] p<0,05 IC vs GC.

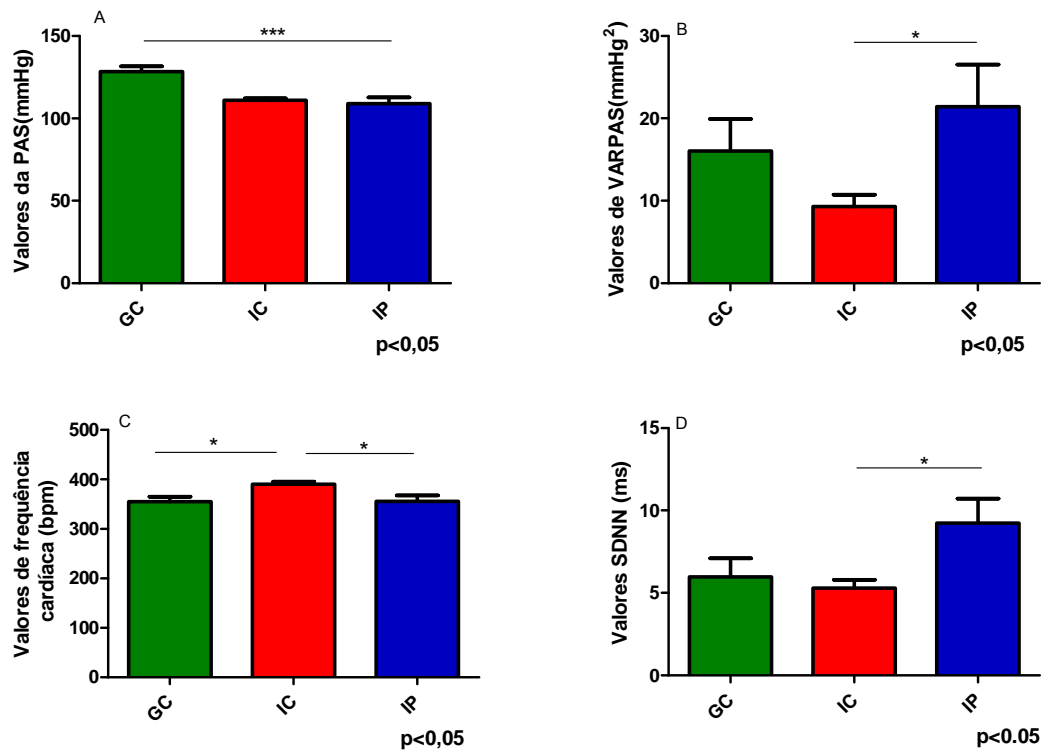


Figura 6 - Valores da Pressão Arterial Sistólica (A), Variância da PAS (B), frequência cardíaca (C) e SDNN (D) no grupo controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP)

5.2 ANÁLISE DE PARÂMETROS ECOCARDIOGRÁFICOS

Pelos resultados apresentados na Tabela 2 demonstramos a presença de áreas de hipo/acinesia no ventrículo esquerdo, de moderada a grande extensão, em ambos os grupos que sofreram ligadura da artéria coronária esquerda (Figura 7 B). Associada a essas alterações, pudemos observar que houve redução significativa na fração de ejeção do ventrículo esquerdo dos grupos infartados, tanto nos não tratados (IC), quanto nos tratados com piridostigmina (IP), quando comparados ao grupo controle (GC) (Figura 7 A)

Tabela 2 - Parâmetros Hemodinâmicos e de ecocardiografia nos grupos controle (GC), Infarto sem tratamento (IC) e Infarto tratado com piridostigmina (IP)

	GC (n=7)	IC (n=6)	IP (n=6)	P
Átrio esquerdo	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,05	0,3 ± 0,01	P>0,05
Volume sistólico final (cm ³)	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,03	0,1 ± 0,02	P>0,05
Volume diastólico final (cm ³)	0,4 ± 0,05	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,01	P>0,05
TRIV (ms)	21,8 ± 1,6	33,0 ± 1,0 [§]	32,0 ± 2,7 [*]	P<0,05
Fração de ejeção (%)	77,1 ± 1,5	29,5 ± 1,2 [§]	28,3 ± 4,5 [*]	P<0,05
Área de infarto (%) (hipo/acinesia)	0	46,3 ± 3,3 [§]	48,6 ± 1,8 [*]	P<0,05

TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico. Apresentados em média dos valores ± erro padrão. ^{*}p<0,05 IP vs GC. [#]p<0,05 IP vs IC. [§]p<0,05 IC vs GC.

No estudo da função diastólica, notou-se um aumento significativo do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) nos grupos infartados, tratado e não tratados em relação ao grupo controle (Figura 7 C).

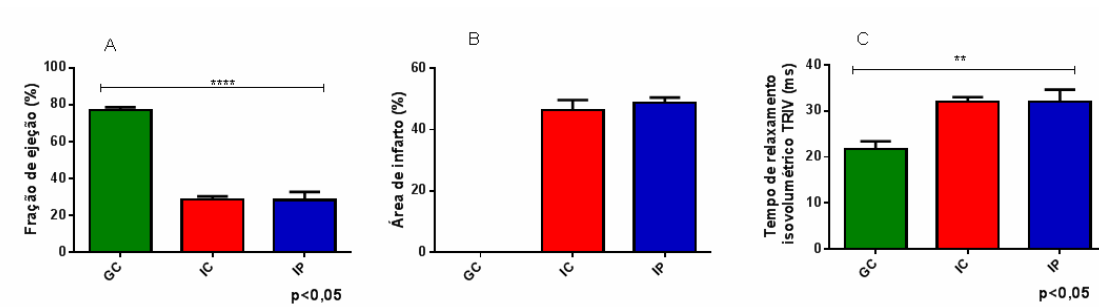


Figura 7 - Avaliação ecocardiográfica de fração de ejeção (A), área de infarto (hipo/acinesia) (B) e tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) no grupo controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e tratado com piridostigmina (IP)

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS PELO MÉTODO ELISA

Pela análise de Tabela 3 podemos observar que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas nas dosagens de IL1, IL6 e TNF α , em tecido cardíaco analisado, entre os grupos (Figura 8). Ocorreu um aumento de IL 1 no grupo infartado sem tratamento, mas não atingiu significância estatística.

Tabela 3 - Quantificação de citocinas em tecido cardíaco do grupo controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP)

	GC (n=4)	IC (n=10)	IP (n=8)	P
IL 1 (pg/ml)	88,6 \pm 19,9	172,7 \pm 27,8	144,4 \pm 32,3	>0,05
IL 6 (pg/ml)	448,6 \pm 84,2	396,9 \pm 61,1	448,7 \pm 34,8	>0,05
TNF α (pg/ml)	86,5 \pm 19,7	72,2 \pm 20,7	59,7 \pm 13,5	>0,05

p significativo < 0,05. Apresentados em média dos valores \pm erro padrão

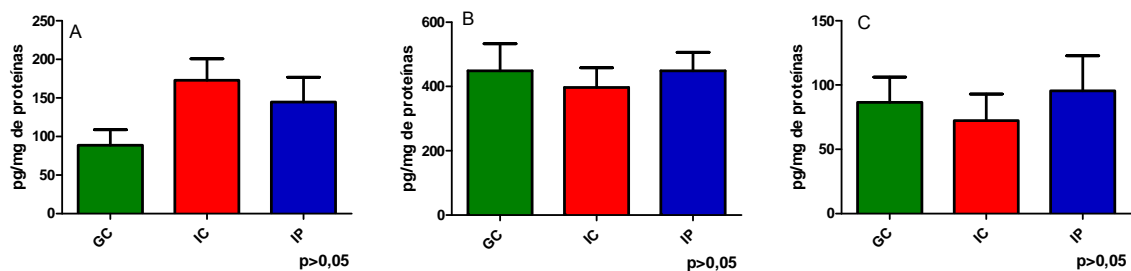


Figura 8 - Gráficos da dosagem de IL 1 (A); IL 6 (B) e TNF α (C) em tecido cardíaco nos grupos controle (GC); Infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP)

5.4 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4⁺ E CD8⁺ E FOXP3⁺ PELA CITOMETRIA DE FLUXO

Com o objetivo de discriminar os linfócitos ativados, inicialmente marcamos as células CD4⁺ e CD8⁺ com anticorpos CD25⁺ (anti receptores de IL 2) e RT1B⁺ (marcadores de moléculas apresentadoras de antígenos da classe MHCII). Uma vez identificados os linfócitos (CD4⁺CD25⁺) e (CD8⁺CD25⁺) buscamos determinar a subpopulação que apresentava o complexo de membrana Foxp3⁺, que caracteriza as células T reguladoras.

Os linfócitos ativados que não expressam esse complexo são denominados “convencionais” (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ e T CD8⁺CD25⁺Foxp3⁻); os linfócitos que expressam a Foxp3 são chamados “reguladores” ou Tregs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, e T CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺). Apresentaremos, portanto, os dados percentuais dessas subpopulações de linfócitos no sangue periférico e no baço.

Tabela 4 Valores percentuais da expressão de marcadores de atividade de Linfócitos T CD4⁺ no sangue e baço do grupo controle (GC), Infartado sem tratamento (IC) e Infartado tratado com piridostigmina (IP)

	GC (n=12)	IC (n=12)	IP (n=11)	P
CD4⁺ sangue				
CD25⁺Total (%)	6,7 ± 0,3	8,4 ± 0,3	6,2 ± 0,3 [#]	<0,05
CD25⁺Foxp3⁻ (%)	2,3 ± 0,2	2,2 ± 0,2	1,5 ± 0,2 [#]	<0,05
CD25⁺Foxp3⁺ (%)	70,6 ± 3,2	63,5 ± 1,4	76,5 ± 2,9 [#]	<0,05
CD4⁺ baço				
CD25⁺Total (%)	9,2 ± 0,4	10,9 ± 0,4	7,4 ± 0,3 [#]	<0,05
CD25⁺Foxp3⁻ (%)	1,5 ± 0,1	2,2 ± 0,2	1,4 ± 0,2 [#]	<0,05
CD25⁺Foxp3⁺ (%)	84,6 ± 0,9	82,6 ± 1,5	79,9 ± 1,8	>0,05

Apresentados em média dos valores ± erro padrão *p<0,05 IP vs GC. [#]p<0,05 IP vs IC.
[§]p<0,05 IC vs GC.

O grupo de animais infartados e não tratado (IC) apresentou, no sangue periférico e no baço, significativo aumento de linfócitos T CD4⁺ totais (Figura 9 A, D) e menor porcentagem de linfócitos T CD4⁺ reguladores (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) no sangue periférico quando comparado ao grupo controle (Figura 9 C). Porém, no grupo tratado com piridostigmina (IP) quando comparados ao grupo não tratado (IC) observamos redução significativa de linfócitos T CD4⁺ totais (Figura 9 A,D) e do subgrupo de linfócitos convencionais (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻) (Figura 9 B,E) tanto no sangue quanto no baço. Ainda, o grupo infartado tratado com piridostigmina (IP), apresentou significativo aumento de linfócitos reguladores (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) no sangue periférico, comparado com o grupo infartado não tratado (Figura 9 C).

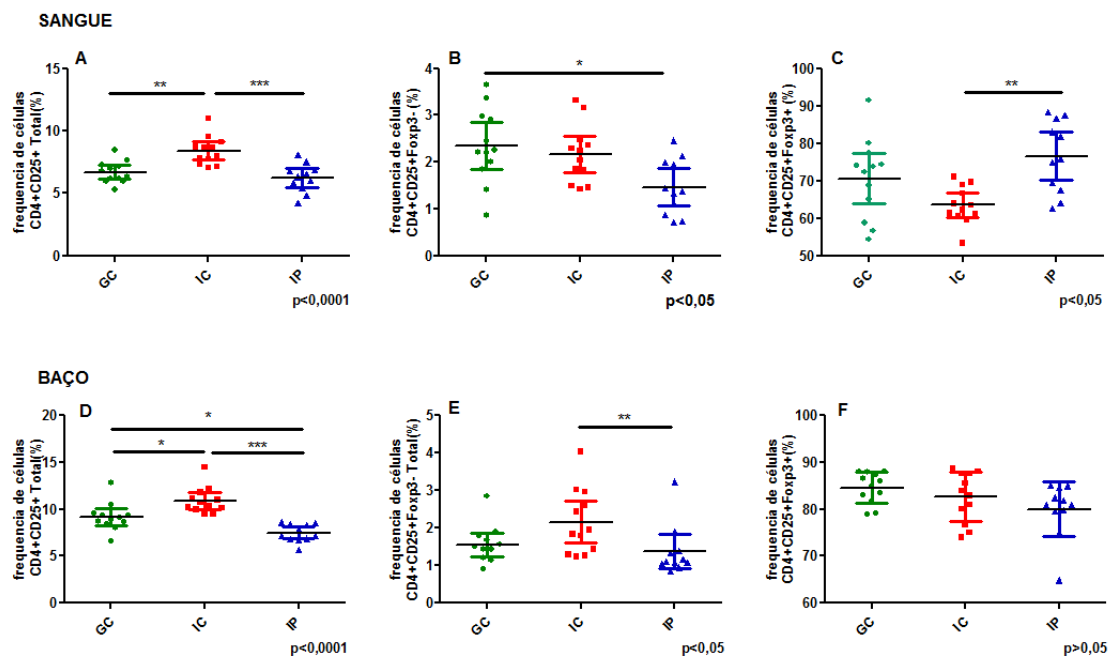


Figura 9 - Concentração de CD4⁺CD25⁺total (A), CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ (B) e CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (C) no sangue periférico e CD4⁺CD25⁺total (D), CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ (E) e CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (F) no baço de animais do grupo controle (GC), grupo infartado sem tratamento (IC) e grupo infartado tratado com piridostigmina (IP)

Na análise dos linfócitos CD8⁺ observamos que no grupo infartado sem tratamento (IC) em relação ao grupo controle (GC): significativo aumento de CD8⁺ total (Figura 10 A,) e de linfócitos T convencionais (Figura 10B), e redução significativa do número de linfócitos reguladores (CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺) no sangue periférico (Figura 10 C).

Tabela 5 - Valores percentuais da expressão de marcadores de atividade de Linfócitos T CD8⁺ no sangue e baço do grupo controle (GC), Infartado sem tratamento (IC) e Infartado tratado com piridostigmina (IP)

	GC (n=12)	IC (n=12)	IP (n=11)	P
CD8⁺ sangue				
CD25 ⁺ Total (%)	3,5 ± 0,3	4,5 ± 0,2	2,4 ± 0,1 [#]	<0,05
CD25 ⁺ Foxp3 ⁻ (%)	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,9	1,1 ± 0,1 [#]	<0,05
CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (%)	76,1 ± 2,8	68,3 ± 1,9	75,1 ± 1,0 [#]	<0,05
CD8⁺ baço				
CD25 ⁺ Total (%)	3,3 ± 0,1	4,3 ± 0,2	1,9 ± 0,1 [#]	<0,05
CD25 ⁺ Foxp3 ⁻ (%)	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1 [#]	<0,05
CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (%)	75,7 ± 2,1	74,9 ± 1,8	71,7 ± 1,8	>0,05

Apresentados em média dos valores ± erro padrão *p<0,05 IP vs GC. [#]p<0,05 IP vs IC.
[§] p<0,05 IC vs GC.

O grupo tratado com piridostigmina (IP) levou a significativas alterações comparado ao grupo infartado não tratado (IC): menor número de linfócitos CD8⁺ total (Figura 10 A) e de linfócitos T convencionais (CD8⁺CD25⁺Foxp3⁻) no sangue (Figura 10 B), e maior número de linfócitos T reguladores (CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺) (Figura 10 C).

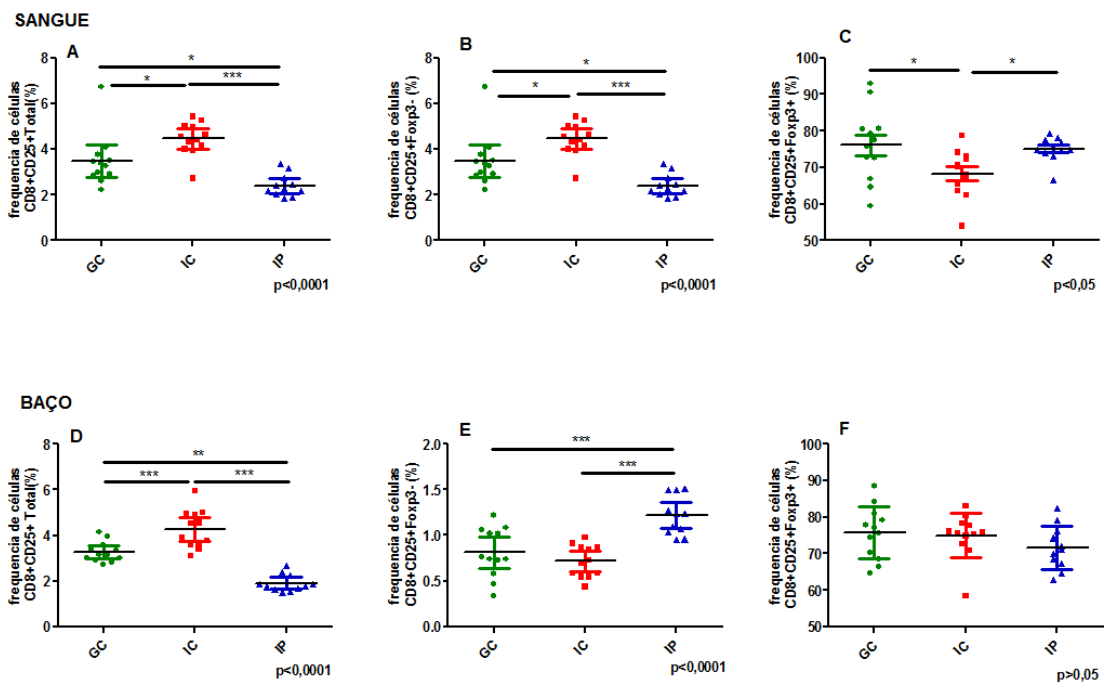


Figura 10 - Concentração de CD8⁺CD25⁺total (A), CD8⁺CD25⁺Foxp3⁻ (B) e CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ (C) no sangue periférico e CD8⁺CD25⁺total (D), CD8⁺CD25⁺Foxp3⁻ (E) e CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ (F) no baço de animais do grupo controle (GC), grupo infartado sem tratamento (IC) e grupo infartado tratado com piridostigmina (IP)

No baço, o grupo infartado não tratado (IC) apresentou aumento significativo de CD8⁺ total (Figura 10 D), Nos animais infartados tratados com piridostigmina (IP) demonstramos redução do número de CD8⁺ total (Figura 10 D) e aumento do CD8⁺ convencional (Figura 10 E).

Na análise geral, podemos observar que o infarto do miocárdio promove queda na expressão de linfócitos reguladores tanto do subtipo CD4⁺ quanto CD8⁺ no sangue. De forma significativa, o tratamento com piridostigmina promove redução dos linfócitos convencionais do subtipo CD4⁺ tanto no sangue, quanto no baço e redução de linfócitos CD8⁺ no sangue com aumento no baço. Com relação aos linfócitos reguladores observamos aumento destes linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ no sangue, no entanto sem alteração destes níveis no baço.

5.5 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS CD4 E CD8 NO CORAÇÃO PELA IMUNOHISTOQUÍMICA

A área central do infarto no miocárdio foi marcada por grande quantidade de linfócitos CD4 e de CD8 entretanto, essas células também estiveram presentes nas regiões peri-infarto. O estudo da mobilização no músculo cardíaco de CD4 mostrou-nos que no grupo infartado não tratado (IC) quando comparado com o grupo controle existe uma maior mobilização de CD4 em área infartada (AI) e área peri-infarto (API).

Tabela 6 - Percentagem de linfócitos T CD4 em área infartada (AI), área peri-infarto (API) e área total nos grupos controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP)

CD4	GC (n=6)	IC (n=7)	IP (n=8)	P
Área Total (%)	4,74	24,7 [§]	26,9 [*]	<0,05
infartada (%)	0	12,2 ± 2,5	20,9 ± 6,5 [#]	<0,05
Peri-infarto (%)	4,74 ± 0,5	12,5 ± 4,8	6,0 ± 1,2	>0,05

Apresentados em média dos valores ± erro padrão *p<0,05 IP vs GC. #p<0,05 IP vs IC.
[§] p<0,05 IC vs GC.

Quando comparamos o grupo infarto tratado (IP) com o grupo infartado não tratado (IC) observamos um significativo aumento de marcação de CD4 em área infartada (Figura 11 AI) e redução desta marcação em área peri-infarto (Figura 11 API) .

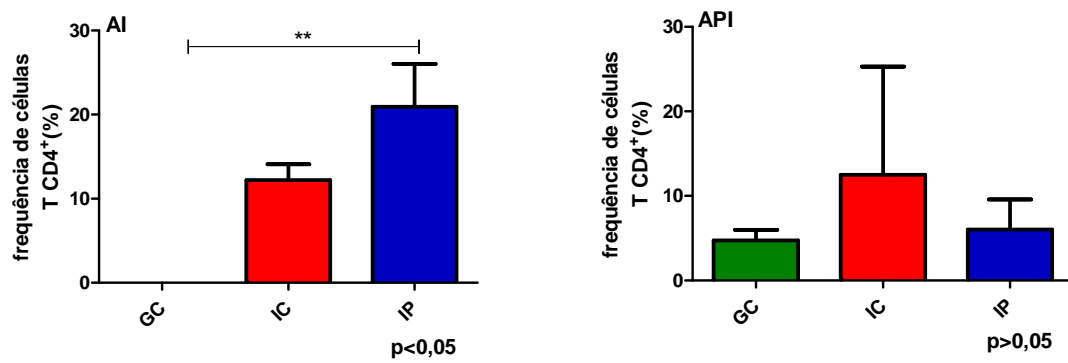


Figura 11 - Representação gráfica da concentração de Linfócitos T CD4 em área infartada (AI) e área peri-infarto (API)

Esses achados podem ser visualizados de modo qualitativo na Figura 12.

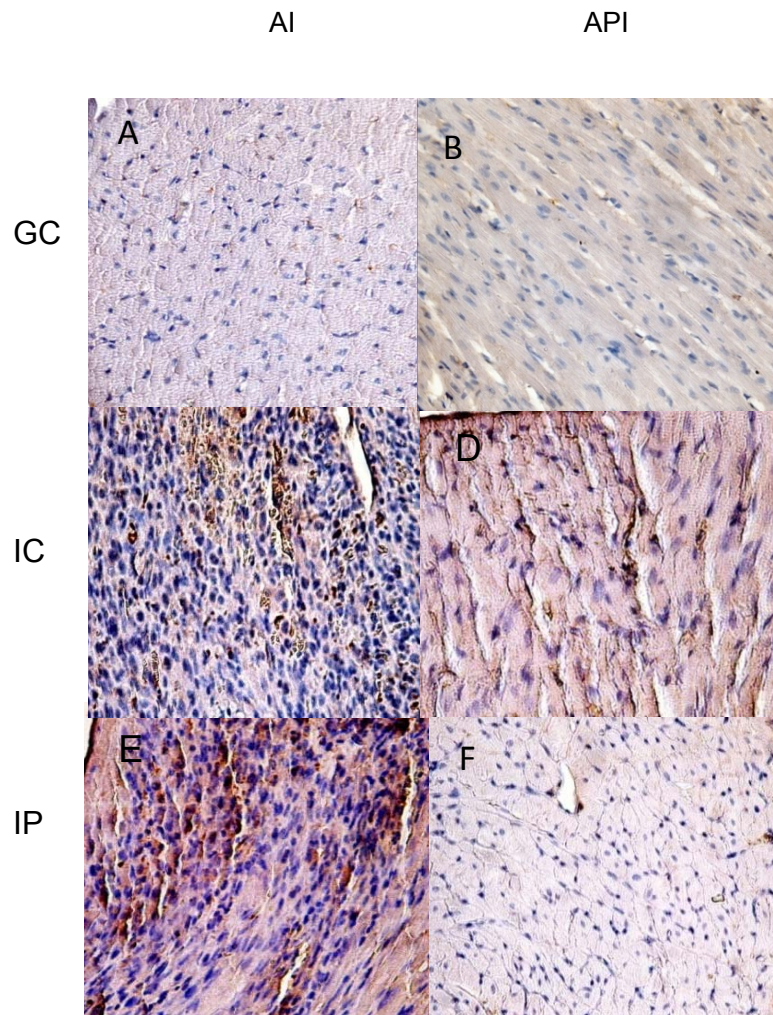


Figura 12 - Análise Imunohistoquímica da expressão de Linfócitos T CD4 em grupos controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP), em área infartada (AI) e área peri-infarto (API)

Quando analisamos os linfócito T CD8 , observamos um aumento de forma semelhante, no grupo infartado não tratado (IC) uma grande marcação em área central do infarto e na área peri-infarto. No grupo com infarto tratado com piridostigmina (IP), verificamos que houve marcação mais acentuada na área central do infarto, comparando-se com o grupo infartado sem tratamento (Tabela 7, Figura 13).

Tabela 7 - Percentagem de linfócitos T CD8 em área de infartada (AI), área peri-infarto (API) e área total nos grupos controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP)

CD8	GC (n=6)	IC (n=7)	IP (n=8)	P
Área Total (%)	2,7	9,2 [§]	23,8 [*]	<0,05
infartada (%)	0	5,8 ± 1,1	17,9 ± 2,8 [#]	<0,05
peri-infarto (%)	2,7 ± 0,1	3,4 ± 0,4	5,9 ± 1,1 [*]	>0,05

Apresentados em média dos valores ± erro padrão *p<0,05 IP vs GC. #p<0,05 IP vs IC. § p<0,05 IC vs GC.

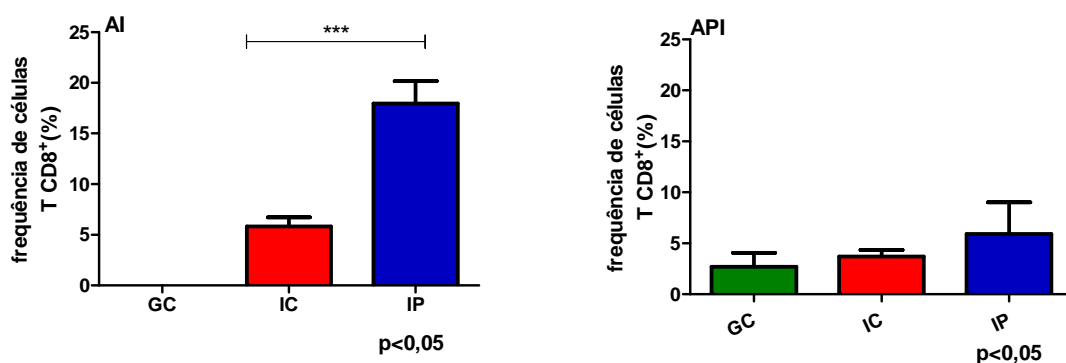


Figura 13 - Representação gráfica da concentração de Linfócitos T CD8 em área infartada (AI) e área peri-infarto (API)

Esses achados podem ser visualizados de modo qualitativo na Figura 14.

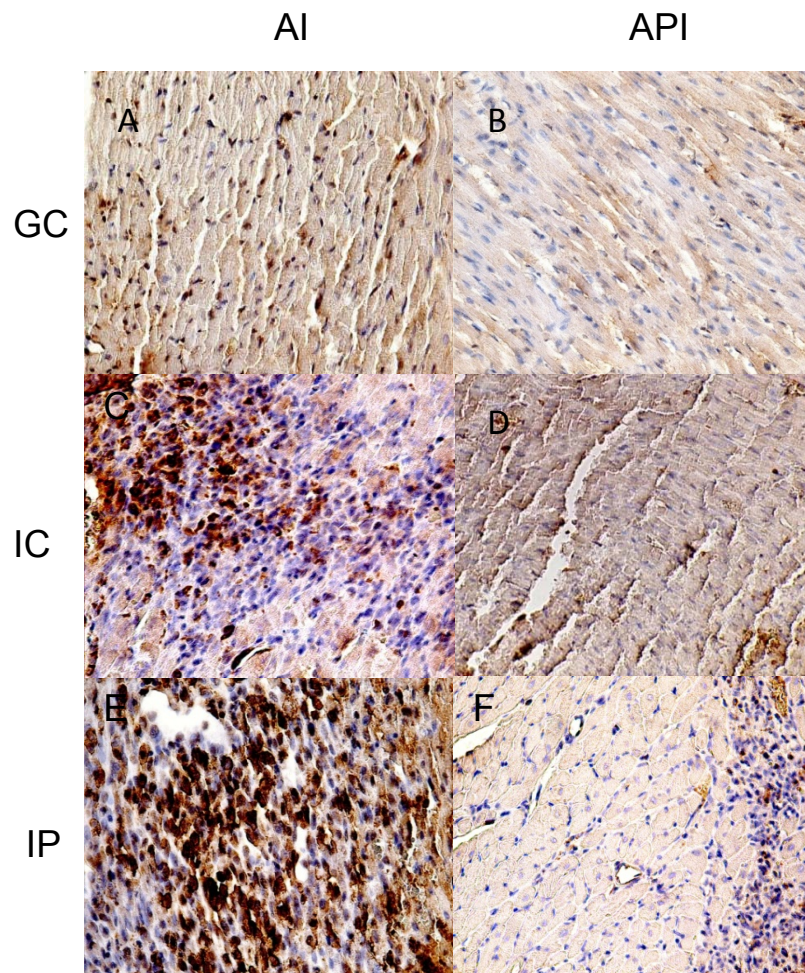


Figura 14 - Análise Imunohistoquímica da expressão de Linfócitos T CD8 em grupos controle (GC), infartado sem tratamento (IC) e infartado tratado com piridostigmina (IP), em área infartada (AI) e área peri-infarto (API)

Na avaliação global dos campos observamos que no grupo infartado não tratado (IC) evidenciou-se um significativo aumento da marcação de CD4 e CD8 em área infartada (AI) e área peri-infarto (API). No entanto, no grupo tratado com piridostigmina (IP) ocorreu um aumento da marcação de

CD4 e CD8 em área infartada e redução da marcação de CD4 em área peri-infarto (API) com alteração não significativa da marcação de CD8 nesta região.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo registra a primeira evidência de que a estimulação vagal indireta modula o processo inflamatório no infarto agudo do miocárdio por meio da mobilização de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, em especial, pelo aumento de linfócitos reguladores (Foxp3⁺). Este efeito pode contribuir na redução de danos e no melhor remodelamento ventricular que se segue ao IAM.

Estudo recente demonstrou que a estimulação elétrica do nervo vago em ratos insuficiência cardíaca crônica induzida pós IAM, atenuou o remodelamento cardíaco e melhorou marcadamente o prognóstico, sugerindo que a ativa correção da modulação autonômica (desequilíbrio simpato-vagal) pode ser uma nova estratégia terapêutica nessa situação patológica.¹⁴¹ Em camundongos com 28 dias de IAM, a estimulação elétrica de curta duração (15 min) foi suficiente para alterar o estado redox inibindo a geração de radicais livres em miocárdio, potencialmente dependente da redução do drive simpático e da ação direta da acetilcolina no estado inflamatório do miocárdio.³² Outros estudos demonstraram que a estimulação elétrica vagal reduz a ocorrência de taquiarritmia ventricular letal por manter íntegros os mecanismos de conexão intercelular.¹⁴² De forma geral, o conceito de que o aumento da modulação do sistema parassimpático (estimulação vagal) se associa à melhora da sobrevida e do remodelamento cardíaco na insuficiência cardíaca congestiva já foi transferido da bancada para o leito.^{167,168} Essa abordagem é o exemplo do conceito atual da medicina translacional.¹⁶⁹ Os resultados iniciais publicados

recentemente do impacto do dispositivo de estimulação elétrica do vago em pacientes com insuficiência cardíaca apontam para a segurança do procedimento e apresentam resultados de melhora da qualidade de vida dos pacientes.¹⁷⁰ Um estudo prospectivo e multicêntrico está em andamento e virá a responder o impacto em eventos cardiovasculares nessa população.¹⁷¹

Com relação aos mecanismos que relacionam a estimulação vagal e a melhora no remodelamento cardíaco após o IAM, a inflamação vem tendo destaque na última década. Reconhece-se o papel importante da inflamação no desenvolvimento da doença aterosclerótica, desde suas fases iniciais, até a manifestação das síndromes coronarianas agudas.^{5,39,40,41,44}

Nesse contexto, há informações de que há associação entre menor modulação vagal e maior atividade simpática, aferidos por meio da análise da variabilidade da FC com marcadores inflamatórios em portadores de doença arterial coronária¹⁴³ e até mesmo em adultos jovens, como publicado no estudo CARDIA.¹¹⁹ Essas observações reforçam a hipótese de que uma menor atividade anti-inflamatória, mediada pelo vago pode permitir uma produção excessiva de citocinas em humanos¹¹⁹ e até mesmo sugerir que análise da VFC pode ser usada como biomarcador para identificar pacientes com doenças associadas a aumento de citocinas que poderiam beneficiar-se com a estimulação da via anti-inflamatória colinérgica.¹⁴⁴

Estamos agora avançando na hipótese de que o benefício da estimulação vagal ocorre muito mais precocemente, quando a isquemia miocárdica se instala e se inicia o processo de remodelamento cardíaco. De

fato, existem alguns estudos na literatura que avaliaram a estimulação elétrica do nervo vago em modelo de IAM em animais de isquemia reperfusão.^{35,141,172}

Nosso estudo foi o primeiro a usar em modelo de IAM em ratos, o aumento da atividade vagal pela estimulação farmacológica, por meio da administração do anticolinesterásico piridostigmina, e observar a influência desse tratamento em marcadores inflamatórios e na modulação de linfócitos T em fase precoce da isquemia permanente.

A piridostigmina, que inibe a hidrólise da acetilcolina liberada pelos neurônios colinérgicos, vem sendo usada em diferentes modelos, animais³⁷ e humanos^{145,146}, mostrando-se ser efetiva no aumento da atividade vagal. Consideramos que no presente estudo a administração de piridostigmina foi efetiva em aumentar a atividade vagal, tomando como base a redução da frequência cardíaca e o aumento da variável SDNN da variabilidade da FC no domínio do tempo, que se relaciona de forma direta com a atividade vagal. Não observamos no grupo (IP), comparado ao grupo infartado sem tratamento (IC), diferenças significativas em outros parâmetros de VFC, incluindo aqueles relacionados à variabilidade da FC no domínio da frequência, e na sensibilidade do baroreflexo. A dose e a via de administração foram semelhantes às utilizadas em recente publicação do grupo³⁷, onde se evidenciou melhora de parâmetros autonômicos, como aumento da sensibilidade do baroreflexo e redução da modulação simpato-vagal (relação LF/HF), associado à melhora dos componentes morfofuncionais de ratos infartados tratados com piridostigmina. Apesar de

no presente estudo, comparado com o estudo prévio, a redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo estar mais acentuada (respectivamente, 29% VS 47%) e com maior repercussão hemodinâmica (mais hipotensão e taquicardia reflexa), não detectamos aumento da modulação simpática pela análise da variabilidade da FC. Entretanto, já foi descrito que, em situações que cursam com descarga simpática muito exacerbada, como na insuficiência cardíaca, o componente LF da VFC pode não estar aumentado, e estar até reduzido.^{173,176} É interessante notar que a redução da FC de repouso observada no grupo infartado que recebeu piridostigmina não se acompanhou de queda da PA. Essa resposta corrobora observações prévias na literatura, feitas em estudos com animais normais e após IAM. A atividade vagal reduz a FC, a contração miocárdica e o consumo de oxigênio.¹⁷³ O menor trabalho cardíaco poderia *per se* ter um impacto positivo no remodelamento cardíaco. Porém, demonstrou-se, em modelo animal de isquemia/reperfusão, que a estimulação do nervo vago associada à manutenção da FC por meio de estimulação direta cardíaca, ainda é capaz de limitar a área infartada e reduzir a resposta inflamatória.¹⁷² Ainda, estudos anteriores demonstraram que a piridostigmina apesar de reduzir a FC de repouso, melhora o perfil hemodinâmico e autonômico em pacientes com insuficiência cardíaca durante exercício dinâmico e reduz arritmias cardíacas.^{145,146}

Em nosso estudo, utilizamos animais com área de infarto acima de 40% baseado em trabalho anterior que mostra elevação marcada na LVEDP e RVSP apenas em corações com área de infarto maior que 45% através de

análise ecocardiográfica.¹⁴⁷ Com relação às variáveis morfofuncionais, avaliadas por meio da ecocardiografia, notamos redução significativa da fração de ejeção nos grupos infartados tratados e não tratados de igual magnitude, e significativo aumento da TRIV também semelhante em ambos os grupos. Porém vale ressaltar que, as avaliações foram feitas com os animais anestesiados e no terceiro dia pós IAM, portanto, ainda em vigência de processo inflamatório ativo e sem um efetivo remodelamento ventricular. Nesse sentido, no período de observação não se detectou aumento do diâmetro do ventrículo esquerdo entre os grupos infartado e controle, característico da progressão do IAM para a insuficiência cardíaca.

Está bem estabelecido que mediadores inflamatórios são essenciais no processo de cicatrização após IAM, mas uma resposta excessiva pode piorar a injúria miocárdica.^{12-14,18,47} Fica claro que há necessidade de se compreender os mecanismos que regem essa relação, e nesse ponto, a imunomodulação começou recentemente a ser alvo de investigação.

Dentre as citocinas descritas, o TNF α apresenta um papel central na resposta inflamatória dependente da isquemia miocárdica.^{19,20,45,48,54} O TNF α é liberado dos tecidos precocemente, e age, de forma parácrina e autócrina, como amplificador da resposta inflamatória, estimulando a produção de outras citocinas e quimiocinas.³⁵ Além de causar depressão da função miocárdica está associado à arritmias ventriculares.²⁶ Outras citocinas pró-inflamatórias, que participam do processo lesão pós IAM são IL-1 e IL-6.^{45,46,49,50,54} Estudos em modelos animais de inflamação sistêmica (sepsis) foram os primeiros a demonstrar que a estimulação elétrica do nervo vago

reduz a produção de citocinas inflamatórias sistêmicas, em especial, do TNF α , e melhora a sobrevivência dos animais.^{16,21,23} Seguindo-se esta observação, demonstrou-se que a acetilcolina, de forma dose-dependente, reduz a formação de TNF α em macrófagos estimulados por antígenos.¹⁶ A estimulação vagal também reduz a produção de outras citocinas, como IL-1 e IL-6.^{21,23} Em modelos de isquemia/reperfusão, já foi descrito efeito semelhante, com período de observação de 24 hs após o evento isquêmico. No presente estudo, não evidenciamos aumento das citocinas IL-1, IL-6 e TNF α pelo método ELISA no miocárdio isquêmico. Este fato poder ser em decorrência do tempo estipulado de coleta, que ocorreu no terceiro dia pós infarto. O aumento de citocinas começa a ocorrer rapidamente após a injúria miocárdica. Em estudo prévio demonstrou-se aumento pronunciado da expressão de mRNA de IL-1 β e IL-6 em área infartada e em menor proporção na área não infartada, 6 horas após a oclusão da artéria descendente anterior esquerda.⁴⁶ Na área infartada este aumento mantém-se até 12 horas pós infarto, declinando rapidamente após este período. Aumento significativo da expressão mRNA de TNF α também pode ser detectado em área infartada e não infartada com o pico máximo por volta do primeiro dia pós IAM.⁴⁶ A partir do terceiro dia após IAM não existe aumento significativo dessas citocinas no ventrículo esquerdo. No nosso estudo avaliamos a presença de citocinas no miocárdio no terceiro dia após IAM, um momento distante do pico de incremento desses fatores inflamatórios, portanto não podemos afastar a influência do aumento da atividade vagal na produção de citocinas nas primeiras horas pós ligadura de artéria coronária.

A necrose de células miocárdicas elícita uma cascata inflamatória que limpa a área infartada de debris de células e de matrix e promove o reparo do tecido, com a formação de uma cicatriz. Esse reparo cardíaco leva a profundas alterações na arquitetura do ventrículo, denominadas em conjunto como “remodelamento ventricular”. Alterações celulares e moleculares associadas ao remodelamento ventricular afetam a área necrótica e também segmentos não infartados dos ventrículos. E como manifestação clínica, além de alteração da geometria do ventrículo, pode ocorrer comprometimento da função e desenvolvimento de insuficiência cardíaca. A extensão do remodelamento adverso depende da área infartada, mas também é afetada pelas alterações estruturais decorrentes da cicatrização. Nesse sentido, a resposta inflamatória que se segue à injúria isquêmica é de fundamental importância.^{31,175}

O infarto do miocárdio desencadeia a mobilização de linfócitos T por meio da apresentação de antígenos específicos, induzindo a denominada resposta imune adaptativa.^{15,16,111-114,174} No sistema imunológico, os linfócitos T reguladores, tanto CD4⁺ quanto CD8⁺ exercem papel modulador, pois além de estarem envolvidas com a auto-tolerância também suprimem as respostas imunes aberrantes ou excessivas.^{100,148} Os linfócitos T, são fundamentais não só no processo de cicatrização pós infarto¹¹⁰, como também exercem papel importante na modulação desta resposta, visto que a amplificação desta inflamação em região peri-infarto causa lesão de miócitos normais o que agrava a disfunção ventricular levando a piora da sobrevida por falência cardíaca.^{18,149,150} Ilustrando esse conceito, em estudo recente,

avaliou-se o remodelamento ventricular pós infarto em modelos transgênicos de camundongos infartados, onde realizou-se interrupção da função de linfócitos T através de animais Knockout para CD4⁺ (CD4KO), com restrição de resposta de células T(OT-II) ou ablação de células apresentadoras de antígenos(MHCII⁻). No grupo CD4KO houve aumento da dilatação do ventrículo esquerdo e elevação do número de leucócitos e monócitos com aumento de infiltrado inflamatório. Nos grupos OT-II e MHCII⁻ houve aumento da mortalidade e de ruptura ventricular. Em todos os grupos houve redução na densidade de colágeno na zona de infarto, pela redução da matrix de metaloproteinases e este parece ser o fator principal que interferiu negativamente na sobrevida após infarto. Um dado importante deste trabalho foi o registro da drenagem cardíaca de células MHCII e células CD4⁺Foxp3⁺ para linfonodos mediastinais em camundongos infartados.¹¹⁰ Neste contexto a modulação inflamatória através da atuação das células T regulatórias tanto CD4⁺ quanto CD8⁺ parecem ser uma alternativa interessante para novos alvos terapêuticos.

Como bem estabelecido no modelo de sepse^{22,151} é possível que a ativação vagal influencie a modulação da inflamação em modelos de injúria miocárdica. Em modelos de miocardite autoimune em camundongos, induzida por troponina cardíaca murina (Tnl), demonstrou-se que tanto a resposta humoral quanto celular leva a uma inflamação cardíaca grave e fibrose, seguida de cardiomiopatia dilatada e falência cardíaca.^{153,154} No entanto, a ativação da via anti-inflamatória colinérgica, nestes animais, através da ingestão oral de nicotina, tem o potencial de inibir a resposta

autoimune, reduzindo a inflamação miocárdica e a fibrose desencadeada pela imunização por Tnl.¹⁵⁵ Neste mesmo modelo a estimulação da via anti-inflamatória colinérgica provoca uma baixa regulação da matrix-metaloproteinases (MMPs) (MMP14-, -2 e -9) influenciada por componentes da imunidade humoral e adquirida.^{148,154,156}

Este achado comprova, como já registrado em trabalhos anteriores, que o infarto do miocárdio desencadeia a mobilização de células imunes através da produção de antígenos específicos^{15,16,111-113}

No presente estudo, nós demonstramos que a ativação parassimpática colinérgica com piridostigmina em ratos infartados aumenta os níveis séricos de células CD4⁺ e CD8⁺ reguladores (Foxp3⁺) ao contrário dos resultados encontrados em ratos infartados sem tratamento. Observamos que o infarto do miocárdio não tratado leva a um aumento na mobilização de Foxp3⁻ convencional de CD4⁺ em baço e de CD8⁺ em sangue. Com relação a Foxp3⁺ reguladora há redução de CD4⁺ e CD8⁺ ambas em sangue periférico. No grupo tratado com piridostigmina, observamos que, em sangue periférico, há redução de Foxp3⁻ convencional para CD4⁺ e CD8⁺ e aumento de Foxp3⁺ reguladora para CD4⁺ e CD8⁺. No baço, o tratamento com piridostigmina provoca resultados divergentes em relação aos linfócitos convencionais (Foxp3⁻) com redução CD4⁺ e aumento de CD8⁺, no entanto sem alteração significativa em relação aos linfócitos reguladores (Foxp3⁺) para CD4⁺ e CD8⁺. Sugere-se que os linfócitos T CD4⁺ convencionais (Foxp3⁻) frequentemente exercem seus efeitos biológicos após diferenciação pró-inflamatória (ex. Th1 e Th17), e muitos dos efeitos das células T

reguladoras (Foxp3⁺) podem ser atribuídos pela expressão de citocinas anti-inflamatórias.¹⁵² Portanto podemos concluir que o tratamento com a piridostigmina reduz a ativação de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ convencionais (Foxp3⁻) e aumenta a expressão de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ reguladores (Foxp3⁺) no sangue periférico contribuindo desta forma para a modulação inflamatória em infarto do miocárdio experimental.

A presença de células do sistema imune são essenciais para o processo de cicatrização pós infarto. No entanto o desajuste deste processo, aumentando a presença destas células em região peri-infarto pode levar a uma resposta “autoimune” patológica com aumento de danos e piora no remodelamento ventricular.^{18,34,75,110,135,149,150,164} De fato, vários autores demonstraram que existe infiltração de linfócitos em áreas necróticas, assim como em áreas não necróticas após infarto do miocárdio. Linfócitos T CD4 e CD8 foram identificados infiltrados no miocárdio, no entanto, com predominância de linfócitos T CD4¹⁴⁹. Além disso, verificou-se que linfócitos T citotóxicos (CD8) eram ativados durante a evolução do IAM e podiam reconhecer e destruir cardiomiócitos normais in vitro, ou seja, a atividade citotóxica contra cardiomiócitos era específica e induzida por linfócitos CD8.^{149,150} As respostas inflamatórias inadequadas na área não infartada ultrapassa a função fisiológica de remover o tecido necrosado. A extensão patológica dessa autoimunidade é responsável pela injúria miocárdica após o IAM, visto que, linfócitos medeiam esse processo.^{18,149,150}

Em nosso estudo, por meio da análise de áreas específicas do miocárdio com imunohistoquímica, observamos que em ratos infartados

tratados com piridostigmina há um significativo aumento da infiltração de CD4 e CD8 em área infartada, acompanhado de significativa redução da mobilização de linfócitos CD4 em área peri-infarto. Não observamos alterações associadas ao uso de piridostigmina na mobilização de linfócitos CD8 nesta área. A identificação do subtipo de linfócitos (convencionais ou reguladores) infiltrados em tecido cardíaco poderia nos fornecer maiores informações sobre a função destes linfócitos nesta região.¹⁶⁶ A marcação de quimiocinas específicas poderia identificar em área infartada e peri-infarto o recrutamento de subtipos de leucócitos com distintas propriedades. Trabalhos prévios sugerem que recrutamento de células T regs mediada pela quimiocina CCR5 pode reduzir a inflamação pós infarto, prevenindo a excessiva degradação da matrix e atenuando do remodelamento adverso.¹⁶⁶ Considerando o conjunto de resultados obtidos: maior concentração de linfócitos na área infartada, redução de linfócitos CD4 em área peri-infarto, aumento dos níveis de linfócitos reguladores circulantes CD4⁺Foxp3⁺ e CD8⁺Foxp3⁺, podemos inferir que o aumento da atividade parassimpática modula de forma positiva a resposta inflamatória em fase precoce do IAM. Acreditamos ter apresentado elementos que fortalecem a hipótese de que o mecanismo anti-inflamatório vagal tem papel importante na melhora de parâmetros morfofuncionais pós infarto que se observa após uso de piridostigmina, como registrado em trabalhos anteriores.³⁷ Estes resultados estão condizentes com a literatura e podem representar a explicação de um possível mecanismo em que a modulação vagal e a atuação das células T reguladoras proporcionariam uma redução na infiltração inflamatória e

melhora de parâmetros morfofuncionais no infarto agudo do miocárdio.^{17,24,93,157,158,164} Portanto para avaliarmos com maior precisão a ação das células T no processo de cicatrização pós infarto teremos que estudar os subtipos celulares (convencionais e reguladores) visto que possuem atividades diferenciadas. A magnitude de ativação de cada subtipo poderia ser a responsável pela modulação inflamatória e pela extensão do dano ao órgão alvo.

Desde que inúmeras evidências têm demonstrado que a resposta autoimune exerce uma importante função no processo de remodelamento ventricular, grandes expectativas têm se criado em torno da supressão ou regulação deste processo inflamatório. Ensaio clínico usando metilprednisolona, em pacientes com infarto agudo do miocárdio, mostrou resultados catastróficos, com redução da infiltração de leucócitos, porém com atraso do processo de deposição de colágeno e cicatrização, aumento da incidência de arritmias ventriculares e aumento da área de infarto.^{159,160}

Várias drogas anticitocinas quando usadas em larga escala tem mostrado resultados desapontadores.^{161,162} No entanto drogas cardiovasculares, tais como estatinas, IECA e bloqueadores do canal de cálcio, tem reduzido a produção de citocinas e melhorado a função e o remodelamento do ventriculo esquerdo após IAM, mas o mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido, mas parcialmente dependente de modulação inflamatória.¹⁶³ A sinvastatina atenua a produção de citocinas inflamatórias em áreas infartada e não infartada, reduz o depósito de colágeno e melhora a função ventricular.¹¹⁴ Ainda demonstrou-se que a

atorvastatina pode suprimir a resposta TH1 mas sem afetar a resposta TH2 em pacientes com IAM, o que pode ser o mecanismo pelo qual ela previne a insuficiência cardíaca pós IAM.¹⁸

Recentemente, tem-se direcionado a busca de intervenções terapêuticas que evitem a injúria provocada pelo mecanismo de isquemia/reperfusão. Dentro desta linha de pesquisa tem-se estudado drogas que reduzam a ativação de DAMPs, TLRs e o sistema de complemento, que possam levar a amplificação da resposta inflamatória⁵⁶ e aumentem a regulação adaptativa através da administração de células T regs.¹⁶⁴ O grande desafio persiste em inibir partes específicas do sistema imune que causam injúria, sem afetar o adequado processo de cicatrização no IAM.

A descoberta da via anti-inflamatória colinérgica identificou um tipo de receptor (receptor alfa 7 nicotínico da acetilcolina)²², que pode ser alvo de terapias farmacológicas para a modulação de atividade das citocinas. O mecanismo de resposta neuro-imunológica observado nesta via sugere um novo avanço terapêutico, visando à modulação da resposta inflamatória e controle na liberação de citocinas. Dados pré-clínicos favoráveis, sustentam a possibilidade de que a estimulação do nervo vago possa ser adicionada ao arsenal terapêutico futuro, possivelmente substituindo algumas drogas para inibir a produção de citocinas.¹⁴⁴ Um melhor entendimento dessas observações pode prover-nos com novos recursos farmacológicos para controlar a inflamação em inúmeras patologias, entre elas o IAM.

O conhecimento da neuroimunomodulação em modelo de IAM ainda é escasso, e são necessários novos estudos que fortaleçam esta ligação. No entanto, a demonstração de que a via anti-inflamatória colinérgica, além do modelo experimental de sepse, também tenha uma importante atuação em modelos de injúria do miocárdio, abre perspectivas para futuras estratégias terapêuticas e renovam as esperanças de uma nova abordagem no tratamento da insuficiência cardíaca de origem isquêmica.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo nos permite concluir que a estimulação vagal através do brometo de piridostigmina, interfere na mobilização de linfócitos tanto a nível regional quanto sistêmico em fase precoce do infarto agudo do miocárdio em ratos. No miocárdio, esta ação propicia um aumento da concentração de linfócitos T CD4 e CD8 em área infartada e reduz a concentração de linfócito T CD4 em áreas peri-infarto. Como efeito sistêmico a administração de piridostigmina reduz o número de linfócitos T convencionais CD4⁺ e CD8⁺ e aumenta o número de linfócitos T reguladores CD4⁺ e CD8⁺ em sangue periférico. Estas alterações caracterizam uma resposta favorável à redução ou limitação de uma excessiva resposta inflamatória relacionado ao aumento da atividade vagal, que poderia ser um dos mecanismos responsáveis pela melhora dos parâmetros ecocardiográficos morfo-funcionais e melhora do desempenho ventricular encontrados em trabalhos anteriores. Novos estudos que investiguem o papel da neuroimunomodulação nos progressivos tempos do IAM poderiam rastrear os mecanismos celulares e moleculares relacionados à curva de expansão clonal dos linfócitos trazendo-nos preciosas informações que contribuiriam para elucidar a interação da atividade autonômica e resposta imunomoduladora no remodelamento ventricular pós IAM.

8 ANEXOS

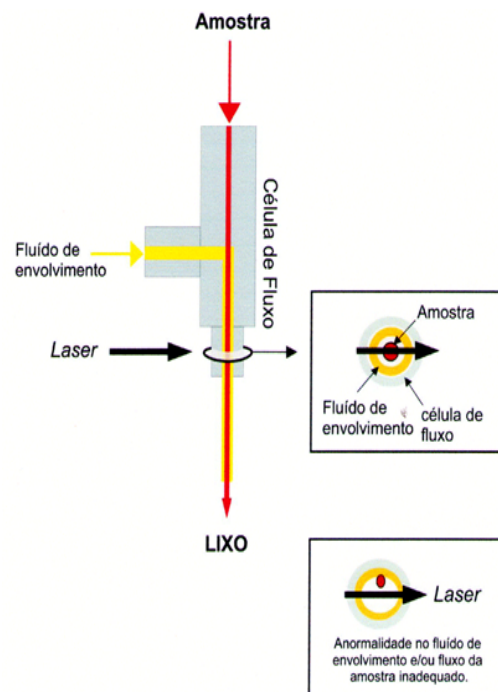
8.1 ANEXO A - Teste ELISA

Iniciou-se a realização do teste ELISA, com a sensibilização das placas de 96 poços com anticorpos de captura específicos para IL-1 , IL-6 e TNF α . Cada placa recebeu 50 μ l /poço de uma solução de 28,6 μ l de anticorpo diluído em 5,15 mL de PBS. Esta placa foi deixada em *overnight*. Foram separadas as peças congeladas de coração e cortadas em pedaços de aproximadamente 40 a 60 mg. Posteriormente foram acondicionadas em tubos com 150 μ l de reagente diluente composto de 5g de BSA e 500 ml de PBS para preparação do homogenato das amostras. Após a lavagem das placas com solução de Tween 20% e incubação por mais uma hora com BSA 5% foi realizada pipetagem dessas amostras em cada poço e incubação por mais duas horas. Posteriormente foi adicionado em cada poço 50 μ l estreptoavidina conjugada à peroxidase e incubação da placa por mais vinte minutos. Após, adicionou-se 50 μ l de solução de substrato composta de H2O2. A reação entre substrato e a estreptavidina produziu uma cor azulada. A tonalidade do azul é proporcional à intensidade da reação. Após incubação por vinte minutos, adicionou-se 25 μ l de solução composta por sulfato de hidrogenio com o objetivo de interromper a reação. Neste instante colocou-se a placa em espectrofotômetro a 450nm para a leitura das amostras em picogramas por mililitros (pg/mL). Cada citocina tem um padrão de concentração na curva padrão. A curva consiste em diluições seriadas do padrão de cada citocina, que já vem estabelecida no Kit do fabricante. Foram utilizados kits de alta sensibilidade (*R & D Systems*®, *Minneapolis, USA*). A diluição pode variar de acordo com o desempenho das amostras. Neste trabalho as diluições variaram de 10 a 20 vezes.

8.2 ANEXO B - Técnica de Citometria de Fluxo

O citômetro de fluxo é equipado para separar e identificar as células, isto é denominado Separação de Célula pela Atividade de Fluorescência (FACS).

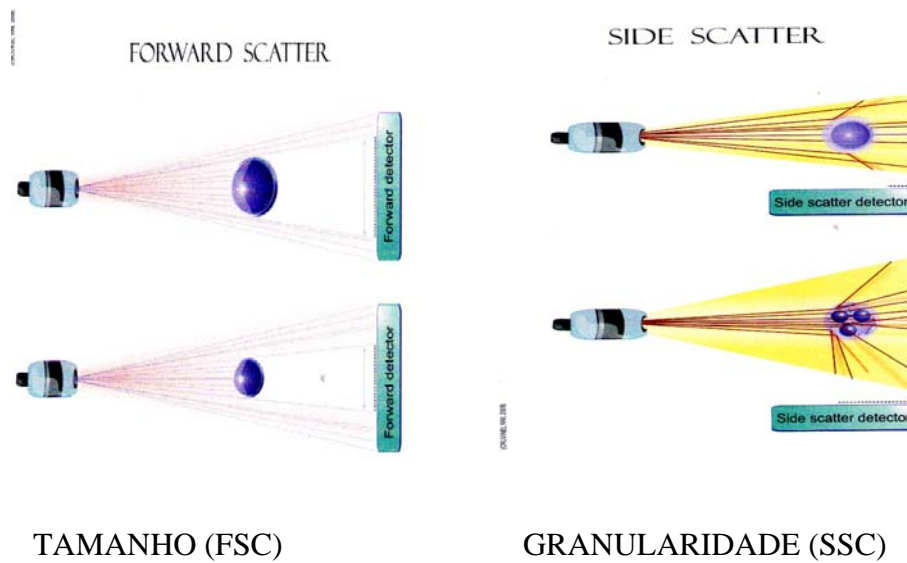
A suspensão de células é injetada através de uma agulha que são alinhadas em um fluxo contínuo por propriedades mecânicas (hidrodinâmica). As células neste fluxo contínuo passam através de uma fonte de luz, geralmente vinda de um laser ou uma lâmpada de mercúrio (Figura 15).



Fonte: Kállas EG

Figura 15 - Fluxo de amostra do citômetro de fluxo

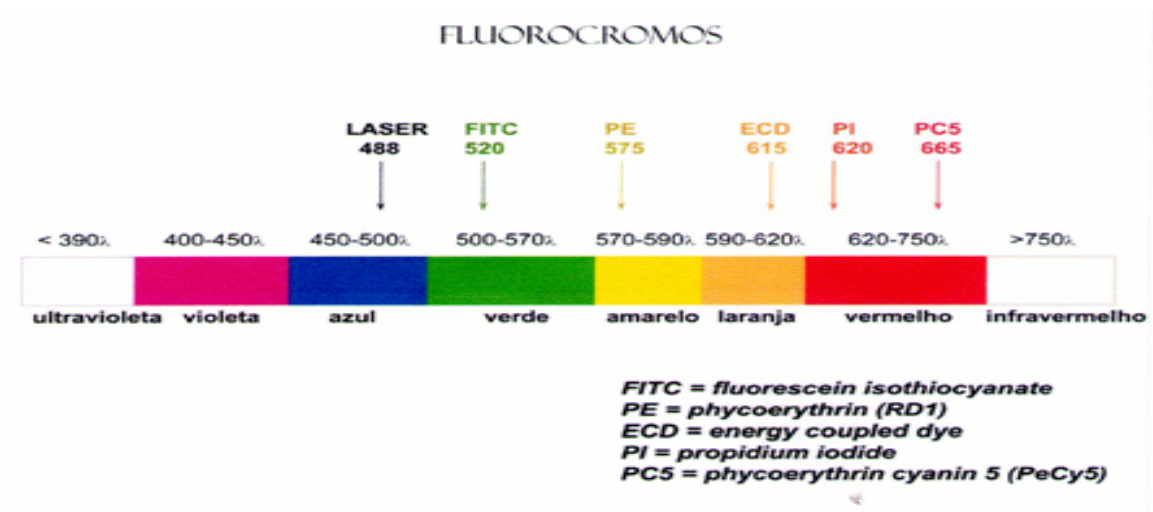
Os primeiros parâmetros a serem identificados são tamanho (FSC – dispersão frontal de luz) e granularidade da célula (SSC – dispersão lateral de luz) (Figura 16).



Fonte: Kállas EG

Figura 16 - Parâmetros identificados pela citometria de fluxo

Usualmente estas células estão marcadas com substâncias químicas que emitem fluorescência (fluorocromos) quando excitados por uma fonte de luz (Figura 17).



Fonte: Kállas EG

Figura 17 - Esquema gráfico da leitura de amostra marcada no citômetro de fluxo

Os fluorocromos absorvem a luz em uma específica onda e emitem em outra, geralmente determinadas em uma escala de *wavelength*. Esses fluorocromos podem ser conjugados com anticorpos, os quais podem ser ligados a moléculas na superfície celular, intracelular e/ou nuclear. A fluorescência é proporcional ao número de moléculas ao qual o anticorpo se liga. As células podem ser enumeradas e caracterizadas individualmente por: especificidade, frequência, função, estado de ativação, diferenciação, viabilidade, etc., que, em conjunto, nos dá informações da fenotipagem de diferentes subpopulações celulares.

A fluorescência pode ser emitida pela célula naturalmente (autofluorescência). A granularidade e a fluorescência são coletadas através de um sistema óptico, transferidas para filtros específicos denominados tubos fotomultiplicadores (PMTs) e posteriormente digitalizadas e analisadas pelo computador (Figura 18).

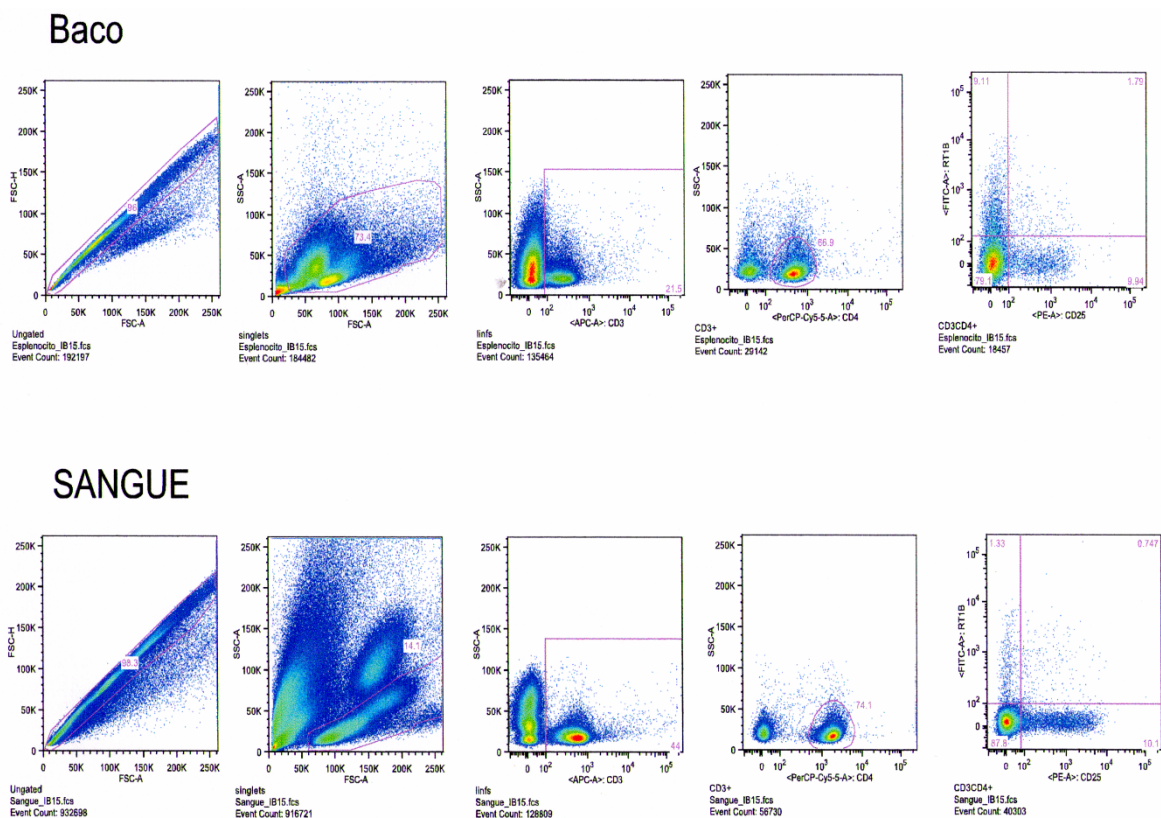


Figura 18 - Identificação de Linfócitos CD4+ ativados em amostras de baço e de sangue pelo FACS e analisados pelo software Flo Jo.

Na avaliação pela citometria de fluxo foi utilizado sangue retirado por punção de átrio direito e macerado do baço, com ressuspensão dos esplenócitos em meio de cultura.

A estratégia de análise utilizada foi:

- *gate* inicial em linfócitos baseado no tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) das células
- *gate* em células CD3⁺CD4⁺ ou CD3⁺CD8⁺
- quadrantes em células que expressam CD25⁺ e/ou RT1B e Foxp3⁺

Obtenção de sangue total: O sangue coletado (500 microlitros) foi transferido para tubo de microcentrifugação BD Microtainer revestido com K²EDTA até o seu processamento no laboratório de imunologia. Foi necessária a realização do processamento no prazo de até 4 horas, visando manter a viabilidade celular. Cem microlitros de sangue total foram utilizados para a fenotipagem celular.

Obtenção de esplenócitos: As células foram obtidas após maceração gentil do órgão e lavadas por centrifugação (1700 rpm a 4°C, por 6 minutos) com 10 ml de meio RPMI (Gibco) (suplementado com L-glutamina 2 mM (Sigma)), solução de aminoácidos não essenciais (1% vol/vol) (Gibco), piruvato de sódio 1mM, 2-ME 5X10⁻⁵ (Sigma) e os antibióticos Gentamicina (40g/mL) e Peflacin (20 g/ml) e vitaminas (1% vol/vol). Em seguida, as células foram tratadas com tampão hemolítico ACK (NH⁴Cl 0,15 M, KHCO³ 1mM, Na²EDTA 0,1 mM) para lise das hemáceas e em seguida lavadas por centrifugação duas vezes com 10 mL meio RPMI como citado acima. Ao final das lavagens, 1X10⁶ células foram utilizadas para fenotipagem por citometria de fluxo, como descrito a seguir.

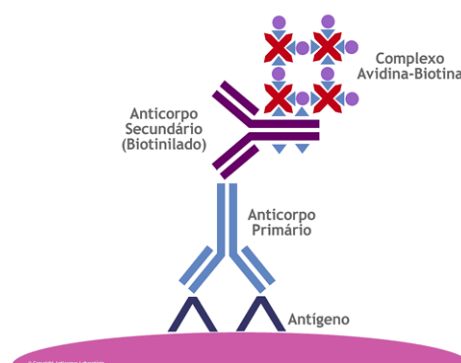
Fenotipagem de esplenócitos e de sangue total: A fim de avaliar o perfil fenotípico dos esplenócitos e das células do sangue periférico dos animais inclusos em nosso estudo, utilizamos o painel de citometria de fluxo descrito em Anexo D. Para fenotipagem de esplenócitos após maceração do baço e lise das hemáceas, um milhão de esplenócitos foram isolados e ressuspensos em 50 µL de tampão de citometria com a diluição dos anticorpos como mostrado em Anexo D.. Após homogeneização, as células foram incubadas, protegidas da luz a 4°C por 30

minutos. Após incubação, as células foram lavadas 2 vezes com 200 μ L de tampão de citometria e ressuspensas em 100 μ L de PFA 1% para aquisição em citometro.

Para fenotipagem de sangue total, a 100 μ L do sangue obtido por punção atrial, foram adicionados os anticorpos do Anexo D, na concentração indicada. A incubação foi realizada a temperatura ambiente em local escuro por 20 minutos. Após incubação, foram adicionados 2 ml de tampão de lise comercial a cada tubo, a fim de lisar as hemáceas e fixar a marcação já realizada. Para tal processo, as células foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, também protegidas da luz. Em seguida, 2 lavagens foram realizadas com tampão PBS com centrifugação a 500 g por 10 minutos. Finalmente as células foram ressuspensas em 100 μ L de PFA 1% para aquisição em citometro de fluxo. As amostras foram adquiridas em um citômetro FACS Canto utilizando o software DIVA (Tree Star, Inc). Para ajuste das voltagens foram utilizadas *beads* marcadas com os fluorocromos individualmente. Cinquenta mil eventos foram adquiridos no *gate* de linfócitos.

8.3 ANEXO C - Técnica de Imunohistoquímica

O termo imunohistoquímica surgiu das palavras: imunologia, histologia e química. A imunologia estuda o sistema imunológico, a histologia estuda tecidos e órgãos utilizando-se do microscópio, após a sua coloração. Para facilitar a observação, diversos tipos de colorações podem ser usados para identificar diferentes partes de um tecido. O processo de identificar antígenos nos tecidos com anticorpos, através de secção corada é definido como imunohistoquímica. Os anticorpos podem ser utilizados para identificar a distribuição anatômica de um antígeno em um tecido ou no interior de compartimentos de uma célula. Neste trabalho utilizamos anticorpos monoclonais através do complexo Avidina-Biotina-peroxidase (ABC) (Figura 19).



Adaptado: <http://www.anticorpos.com.br>

Figura 19 - Método indireto de Imunohistoquímica pelo complexo Avidina-Biotina-Peroxidase

A avidina tem a capacidade de se ligar a quatro moléculas de biotina, de forma não imunológica, esta forte afinidade dá ao método uma excelente sensibilidade.

Os animais submetidos a análise pela Imunohistoquímica foram anestesiados com Ketamina e Xilazina. O tórax foi aberto, cortou-se o átrio direito e perfundiu-se o animal, através de punção, pelo ventrículo esquerdo. Foi induzida

parada cardíaca em diástole pela infusão de solução com cloreto de potássio (14 mmol em solução fisiológica), com pressão constante de 80-90 mmHg por um período de 10 a 15 minutos. Posteriormente, o animal foi perfundido com formol 4% tamponado por mais 10 a 15 minutos. Os tecidos retirados ,foram deixados por 24 a 48 horas fixando em formol 4% tamponado, e posteriormente foram processados. Esse processo necessitou da passagem do tecido cardíaco cortado e acondicionado em reservatório apropriado , por cinco banhos, para desidratação da peça, por concentrações de álcool de variavam de 95% (3 X) e 100% (2X), posteriormente para diafanização em concentrações de 50% de álcool e xilol (1X) e somente xilol (2X). Finalmente foi realizada a embebição em banho de parafina (2X). A diafanização ou clarificação consiste na total retirada de álcool, xilol e tecido gorduroso, para facilitar a embebição com parafina. Após o processamento, os tecidos foram cortados em espessura de 5 µm em micrótomo, imersos em água fria, seguida de água quente, para melhor moldagem na lâmina. Posteriormente as lâminas foram desparafinizadas em estufa e hidratadas em uma sequência banhos de xilol (3X), álcool em concentrações de 100% (2X), 95% (1X), 80% (1X), 70% (1X), 50% (1X) e água destilada. Após secagem em temperatura ambiente, estavam preparadas para receber marcação com anticorpos específicos. Para otimizar a marcação dos linfócitos CD4 e CD8 foi necessário a realização de digestão ou recuperação antigênica, que consiste em colocar as lâminas em solução de citrato 10 mM, PH 6,0 em panela de pressão por 1 minuto. Para o bloqueio da peroxidase endógena, as mesmas foram banhadas em água oxigenada de 10 volumes (3%) durante 7 minutos para CD8 e água oxigenada de 30V (0,3%) para CD4. Posteriormente usou-se caseína 2,5% por 5 min, para o bloqueio de reações inespecíficas. Os anticorpos primários foram diluídos em BSA na concentração de 1/40, tanto para CD4 (W3/25,AbCAM), quanto para CD8(0X-8RT,Millipore). Após pipetagem dos anticorpos, as lâminas foram incubadas em câmara escura e acondicionadas em geladeira a 4°C,em *overnight*.

No dia seguinte incubou-se as lâminas com anticorpo secundário Vector (IgG-mouse) por 30 min à 37°C, seguida por complexo conjugado com peroxidase e AB Vector, por mais 30 min. Após lavagem com TBS, colocou-se as lâminas em solução de cromógeno (Kit DAB Vector – DaKo). A seguir as lâminas forma contra coradas em hematoxilina de Harris, por 1 min.

8.4 ANEXO D – Painel de Citometria de fluxo com especificação de anticorpos utilizados

Anticorpos	Fluorocromio	Clone	Concentração		Laboratório
			Sangue	esplenócito	
CD3	APC	1F4	1:25	1:50	BD Bioscience
CD4	PECY5	OX-35	1:100	1:200	BD Bioscience
CD8	PercP	OX-8	1:100	1:200	BD Bioscience
CD25	PE	OX-39	1:50	1:100	BD Bioscience
RT1B	FITC	OX-6	1:100	1:200	BD Bioscience
Foxp3	PE-Cy7	F JK-16s	1:100	1:200	eBioscience

8.5 ANEXO E – Tabela completa de marcadores de atividade de Linfócitos T CD4⁺ no sangue e no baço

Tabela 8 - Valores percentuais da expressão de marcadores de atividade de Linfócitos T CD4⁺ no sangue e no baço do grupo Controle (GC), Infartado sem tratamento (IC) e Infartado tratado com piridostigmina (IP)

	GC(12)	IC(12)	IP(11)	P
CD4+ sangue				
%CD4+	77,4 ± 0,8	78,1 ± 0,6	76,1 ± 0,7	>0,05
CD25+	6,7 ± 0,3	8,4 ± 0,3	6,2 ± 0,3 [#]	<0,05***
RT1B+	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,7 ± 0,2	>0,05
CD25+total	7,0 ± 0,3	8,9 ± 0,3	6,5 ± 0,4 [#]	<0,05***
RT1B+total	1,7 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,3	>0,05
CD25+RT1B+	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1 [#]	<0,05***
CD25+Foxp3+	70,6 ± 3,2	63,5 ± 1,4	76,5 ± 2,9 [#]	<0,05**
CD25+Foxp3-	2,3 ± 0,2	2,2 ± 0,2	1,5 ± 0,2 [#]	<0,05*
CD4+ baço				
%CD4+	71,1 ± 1,0	71,8 ± 0,9	71,4 ± 0,8	>0,05
CD25+	9,2 ± 0,4	10,9 ± 0,4	7,4 ± 0,3 [#]	<0,05****
RT1B+	6,5 ± 4,3	4,8 ± 0,2 [§]	7,7 ± 0,6 [#]	<0,05***
CD25+total	10,1 ± 0,5	11,6 ± 0,4	8,4 ± 0,3 [#]	<0,05****
RT1B+total	7,4 ± 0,5	5,5 ± 0,2 [§]	8,5 ± 0,7 [#]	<0,05***
CD25+RT1B+	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	>0,05
CD25+Foxp3+	84,6 ± 0,9	82,6 ± 1,5	79,9 ± 1,8	>0,05
CD25+Foxp3-	1,5 ± 0,1	2,2 ± 0,2 [§]	1,4 ± 0,2 [#]	<0,05*

Apresentados em média dos valores ± erro padrão *p<0,05 IP vs GC. [#]p<0,05 IP vs IC.
[§]p<0,05 IC vs GC.

8.6 ANEXO F – Tabela completa de marcadores de atividade de Linfócitos T CD8⁺ no sangue e no baço

Tabela 9 - Valores percentuais da expressão de marcadores de atividade de Linfócitos T CD8⁺ no sangue e baço do grupo Controle (GC), Infartado sem tratamento (IC) e Infartado tratado com piridostigmina (IP)

	GC(12)	IC(12)	IP(11)	P
CD8+ sangue				
%CD8+	24,1 ± 1,4	22,3 ± 0,6	22,2 ± 0,8	>0,05
CD25+	3,5 ± 0,3	4,5 ± 0,2	2,4 ± 0,1 [#]	<0,05****
RT1B+	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,7	2,0 ± 0,2	>0,05
CD25+total	3,7 ± 0,3	4,7 ± 0,2	2,5 ± 0,1 [#]	<0,05****
RT1B+total	1,7 ± 0,2	1,9 ± 0,2	2,1 ± 0,2	>0,05
CD25+RT1B+	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1 [#]	<0,05***
CD25+Foxp3+	76,1 ± 2,8	68,3 ± 1,9 [§]	75,1 ± 1,0 [#]	<0,05*
CD25+Foxp3-	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,9	1,1 ± 0,1 [#]	<0,05****
CD8+ baço				
%CD8+	28,0 ± 1,0	27,5 ± 0,9	26,9 ± 0,8	>0,05
CD25+	3,3 ± 0,1	4,3 ± 0,2	1,9 ± 0,1 [#]	<0,05****
RT1B+	7,1 ± 0,5	4,4 ± 0,1 [§]	7,2 ± 0,6 [#]	<0,05****
CD25+total	3,7 ± 0,1	4,7 ± 0,3	2,2 ± 0,1 [#]	<0,05****
RT1B+total	7,5 ± 0,5	4,8 ± 0,2 [§]	7,4 ± 0,6 [#]	<0,05***
CD25+RT1B+	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,1 [#]	<0,05***
CD25+Foxp3+	75,7 ± 2,1	74,9 ± 1,8	71,7 ± 1,8	>0,05
CD25+Foxp3-	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,1 [#]	<0,05***

Apresentados em média dos valores ± erro padrão *p<0,05 IP vs GC. [#]p<0,05 IP vs IC.
[§]p<0,05 IC vs GC.

9 REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde, 2011, *Sistema Informações sobre Saúde*, Disponível em: DATASUS, 2011. <http://tabnet.datasus.gov.br/>
2. Mackay J, Mensah G. Atlas of heart disease and stroke. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2011.
3. Malta DC, Cezário AC, Moura L, Morais Neto OL, Silva Jr JB. A construção da vigilância e prevenção das doenças crônicas não transmissíveis no contexto do Sistema Único de Saúde. *Epidemiol Serv Saúde*. 2006;15:47-65.
4. Oliveira GMMD, Klein CH, Souza e Silva NAD, Godoy PH, Fonseca TMP. Ischemic heart disease lethality in the State of Rio de Janeiro between 1999 and 2003. *Arq Bras Cardiol*. 2006;86:131-7.
5. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-26.
6. Swirski FK, Pittet MJ, Kircher MF, Aikawa E, Jaffer FA, Libby P, Weissleder R. Monocytes accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:10340-5.
7. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: Pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*. 2006;86:515-81.
8. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:508-19.

9. Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res.* 2008; 79:360-76.
10. Skjot-Arkil H, Barascuk N, Register T, Karsdal MA. Macrophage proteolytic remodeling of the extracellular matrix in atherosclerosis results in neoepitopes: A potential new class of biochemical markers. *Assay Drug Dev Technol.* 2010;8:542-52.
11. Williams HJ, Fisher EA, Greaves DR. Macrophage differentiation and function in atherosclerosis; opportunities for therapeutic intervention? *J Innate Immun.* 2012;45(5-6):498-508.
12. Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1999;43:860-78.
13. Blankesteyn WM, Creemers E, Lutgens E, Cleutjens JP, Daemen MJ, Smits JF. Dynamic of cardiac wound healing following myocardial infarction: observations in genetically altered mice. *Acta Physiol Scand.* 2001;173:75-82.
14. Melguizo C, Prados J, Velez C, Aranega AE, Marchal JA, Aranega A. Clinical significance of antiheart antibodies after myocardial infarction. *Jpn Heart J.* 1997;38:779-86.
15. Tao R, Liao YH, Cheng X, et al. Adoptive transfer of splenocytes of acute myocardial infarction rats mediated myocardial injury. *Chin J Immunol.* 2003;19:642-4.
16. Wang ZH, Liao YH, Dong JH. Experimental study of cardiac myosin-induced autoimmune cardiomyopathy. *Chin J Cardiol.* 2003;31(12): 937-40.

17. Zhang J, Chen J, Liao YH. Myocardial inflammation and remodeling driven by cardiac myosin specific-T lymphocytes. *J Hong Kong Coll Cardiol*. 2005;13(2):130.
18. Cheng X, Liao YH, LI B. Changes of rat lymphocyte proliferation and cytotoxic activity after acute myocardial infarction in vitro. *Chin J Pathophysiol*. 2005;21(9):1848-50.
19. Xiong J, Xue FS, Xu YC, Yang QY, Liao X, Wang WL. Cholinergic agonist may produce preservation of myocardial ischemia/reperfusion injury. *Med Hypotheses*. 2009;73:312-4.
20. Li CL, Jiang J, Fan YQ, Fu GS, Wang JA, Fan WM. Knockout of the tumor necrosis factor α receptor 1 gene can up-regulate erythropoietin receptor during myocardial ischemia-reperfusion injury in mice. *Chin Med J*. 2009;122:566-70.
21. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002;420:853-859.
22. Wang H, Liao H, Ochani M. Cholinergic agonist inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med*. 2004;10:1216-21.
23. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000;May 25;405(6785):458-62.
24. Bernik TR, Friedman SG, Ochani M. Pharmacological stimulation the cholinergic anti-inflammatory pathway. *J Exp Med*. 2002;195:781-8.

-
25. Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Susarla S, Czura CJ, Tracey KJ. Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. *J Vasc Surg.* 2002;36:1231-6.
 26. Xiao H, Chen Z, Liao Y, Cheng X, Liu K, Wang Y. Positive correlation of tumor necrosis factor- α early expression in myocardium and ventricular arrhythmias in rats with acute myocardial infarction. *Arch Med Res.* 2008;39:285-291.
 27. Pavlov VA, Ochami M, Gallowitsch-Puerta M, Ochami K, Huston JM, Czura CJ, Al-Abed Y, Tracey KJ. Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(13):5219-23.
 28. Guarini S, Altavilla D, Cainazzo MM, Giuliani D, Bigiani A, Marini H, Squadrito G, Minutoli L, Bertolini A, Marini R, Adamo EB, Venuti FS, Squadrito F. Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor- κ B activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock. *Circulation.* 2003;107(8):1189-94.
 29. Ulloa L, Tracey KJ. The cytokine profile: a code for sepsis. *Trends Mol Med.* 2005;11(2):56-63.
 30. Rutgeerts P, Van AG, Vermeire S. Review article: infliximab therapy for inflammatory bowel disease – seven years on. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23(4):451-63.
 31. Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res.* 2008;58(2):88-111.

32. Tsutsumi T, Ide T, Yamato M, Kudou W, Andou M, Hirooka Y, Utsumi H, Tsutsui H, Sunagawa K. Modulation of the myocardial redox state by vagal nerve stimulation after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2008;77:713-21.
33. Timmers L, van Keulen JK, Hoefler IE, Meijs MFL, van Middlelaar B, den Ouden K, van Echteld CJA, Pasterkamp G, de Kleijn DPV. Targeted deletion of nuclear factor kB p50 enhances cardiac remodeling and dysfunction following myocardial infarction. *Circ Res.* 2009;104:699-706.
34. Leib C, Katus HÁ, Kaya Z. Cholinergic control of inflammation in cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med.* 2013;23(2):46-51.. Review article. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcm.2012.08.010>
35. 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. Review. *Chin Med J.* 2010;123(19):2720-2726.
36. Xiong J, Yuan YJ, Xue FS, Wang Q, Cheng Y, Li RP, Liao X, Liu JH. Postconditioning with $\alpha 7nAChR$ agonist attenuates systemic inflammatory response to myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Inflammation.* 2012;35(4):1357-64.
37. De La Fuente R, Rodrigues B, Moraes-Silva I, Souza LE, Sirvente R, Mostarda C, De Angelis K, Soares PP, Lacchini S, Consolin-Colombo F, Irigoyen MC. Cholinergic stimulation with pyridostigmine improves autonomic function in infarcted rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2013;40(9):610-6. doi: 10.1111/1440-1681.12121.

-
38. De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA. The transcription factor NF- κ B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000. 20(11): E83–E88.
 39. Johnson JL. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells an atherosclerotic plaque stability. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2007;5:265-82.
 40. Bogaty P, Hackett D, Davies G, Maseri A. Vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina. *Circulation.* 1994;90(1):5-11.
 41. Sun Y. Oxidative stress and cardiac repair/ remodeling following infarction. *Am J Med Sci.* 2007;334(3):197-205.
 42. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev.* 2004; 84: 869-901.
 43. Reith W, Leibundgut-Landmann S, Waldburger JM. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat Rev Immunol,* 2005; 5(10):793-806.
 44. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1685-95.
 45. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2004;61(3):481-97.
 46. Deten A, Volz HC, Wilfried B, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovasc Res.* 2002;55:329-40.

-
47. Shimaoka M, Park EJ. Advances in understanding sepsis. *Eur J Anaesthesiol Suppl.* 2008;42:146-53.
 48. Schulz R. TNFalpha in myocardial ischemia/reperfusion: damage vs. protection. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;45(6):712-14.
 49. Kaminski KA, Kozuch M, Bonda T, Wojtkowska I, Kozieradzka A, Dobrzycki S, Kralisz P, Nowak K, Prolopoczuk P, Winnicka MM, Musial WJ. Coronary sinus concentrations of interleukin 6 and its soluble receptors are affected by reperfusion and may portend complications in patients with myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2009;206:581-87.
 50. Kanda T, Takahashi T. Interleukin-6 and cardiovascular diseases. *Jpn Heart J.* 2004;45:183-93.
 51. Mann DL. Recent insights into the role of TNF in the failing heart. *Heart Fail Rev.* 2001;6:71-80.
 52. Long CS. The role of IL-1 in the failing heart. *Heart Fail Rev.* 2001;6:81-94.
 53. Wollert K, Drexler H. The role of IL-6 in the failing heart. *Heart Fail Rev.* 2001;6:95-103.
 54. Fahim MR, Halim SM, Kamel I. Tumor necrosis factor-alpha in patients with acute myocardial infarction. *Egypt J Immunol.* 2004;11(1):31-7.
 55. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2008;359:473-81.

-
56. Timmers L, Pasterkamp G, de Hoog VC, Arslan F, Appelman Y, Kleijn DPV. The innate immune response in reperfused myocardium. Spotlight Review. *Cardiovasc Res.* 2012;94:276-283.
 57. Lefer AM, Hayward R. The role of nitric oxide in ischemia-reperfusion. In: Loscalzo J, Vita JA. *Nitric oxide and the cardiovascular system.* Totowa, NJ: Humana Press; 2000. p.357-80.
 58. Shames BD, Barton HH, Reznikov LL. Ischemia alone is sufficient to induce TNF-alpha mRNA and peptide in the myocardium. *Shock.* 2002;17:114-9.
 59. Pavlov VA. Cholinergic modulation of inflammation. *Int J Clin Exp Med.* 2008;1(3):203-12.
 60. Nakamura M, Wang NP, Zhao ZQ. Preconditioning decreases Bax expression, PMN accumulation and apoptosis in reperfused rat heart. *Cardiovasc Res.* 2000;45:661-70.
 61. Askari A, Brennan ML, Zhou X, Drinko J, Morehead A, Thomas JT, Topol EJ, Hazen SL, Penn MS. Myeloperoxidase and plasminogen activator inhibitor-1 play a central role in ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Exp Med.* 2003;197:615-24.
 62. Rudolph V, Goldmann BU, Bos C, Rudolph TK, Klinke A, Friedrichs K, Lau D, Wegscheider K, Haddad M, Meinertz T, Baldus S. Diagnostic value of MPO plasma levels in patients admitted for suspected myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2011;153:267-71.
 63. Mocatta TJ, Pilbrow AP, Cameron VA, Senthilmohan R, Frampton CM, Richards AM, Winterbourn CC. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49:1993-2000.

-
64. Nichols TC. NF-kappaB and reperfusion injury. *Drug News Perspect.* 2004;17:99-104.(Review)
 65. Hayden MS, Ghosh S. Signalling to NF-kB. *Genes Dev.* 2004;18:2195-224.
 66. Xiao W. Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. *Cell Mol Immunol.* 2004;1(6):425-35.
 67. Courtois G. The NF-kB signalling pathway in human genetic diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(15):1682-91.
 68. Kabe Y, Ando K, Hirao S, Yoshida M, Handa H. Redox regulation of NF-kB activation; distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7(3-4):395-403.
 69. Valen G, Yan ZQ, Hansson GK. Nuclear factor kappa-B and the heart. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38:307-14. (Review)
 70. Cook-Mills JM. VCAM-1 signals during lymphocyte migration: role of reactive oxygen species. *Mol Immunol.* 2002;39:499-508. (Review)
 71. Arslan F, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8:292-300.
 72. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion-from mechanism to translation. *Nat Med.* 2011;17:1391-1401.
 73. Frangogiannis NG, Ren G, Dewald O, Zymek P, Haudek S, Koerting A, Winkelmann K, Michael LH, Lawler J, Entman ML. Critical role of endogenous thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts. *Circulation.* 2005;111:2935-42.

-
74. Penn MS . The role of leukocyte-generated oxidants in left ventricular remodeling. *Am J Cardiol.* 2008;101(suppl):30D-33D.
 75. Kempf T, Zarbock A, Vestweber D, Wollert KC. Anti-inflammatory mechanisms and therapeutic opportunities in myocardial infarct healing. *J Mol Med.* 2012;90:361-69.
 76. Kelle S, Roes SD, Klein C, Kokocinski T, de Roos A, Fleck E, Bax JJ, Nagel E, Prognostic value of myocardial infarct size and contractile reserve using magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54:1770-77.
 77. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Clin Cardiol.* 2000;35:569-82.
 78. St John Sutton M, Lee D, Rouleau JL, Goldman S, Plappert T, Braunwald E, Pfeffer MA. Left ventricular remodeling and ventricular arrhythmias after myocardial infarction. *Circulation.* 2003;107:2577-82.
 79. Bolognese L, Neskovic AN, Parodi G, Cerisano G, Buonamici P, Santoro GM, Antoniucci D. Left ventricular remodeling after primary coronary angioplasty: patterns of left ventricular dilation and long-term prognostic implications. *Circulation.* 2002;106:2351-57.
 80. Onai Y, Suzuki J, Maejima Y, Haraguchi G, Muto S, Itai A, Isobe M. Inhibition of NF-(kappa) B improves left ventricular remodeling and cardiac dysfunction after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H530-H538.

-
81. Akpek M, Kaya MG, Lam YY, Sahin O, Elcik D, Celik T, Ergin A, Gibson CM. Relation of neutrophil/lymphocyte ratio to coronary flow to in-hospital major adverse cardiac events in patients with ST-elevated myocardial infarction undergoing primary coronary intervention. *Am J Cardiol.* 2012;110:621-27.
 82. Nuñez J, Nuñez E, Bodi V. Usefulness of the neutrophil to lymphocyte ratio in predicting long-term mortality in ST segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2008;101:747-52.
 83. Sanchis J, Bodi V, Nuñez J. Prognostic usefulness of white-blood cell count on admission and one-year outcome in patients with non-ST elevation acute chest pain. *Am J Cardiol.* 2006;98:885-9.
 84. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2002;53:31-47.
 85. Horne BD. Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:1638-43.
 86. Dragu R, Zuckerman R, Suleiman M. Predictive value of White blood cell subtypes for long-term outcome following myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2008;196:405-12.
 87. Meissner J, Irfan A, Twerenbold R, Mueller S, Reiter M, Haaf P, Reichlin T, Schaub N, Winkler K, Pfister O. Use of neutrophil count in early diagnosis and risk stratification of AMI. *Am J Med.* 2011;124:534-42.
 88. Yan X, Anzai A, Katsumata Y, Matsushashi T, Ito K, Endo J, Yamamoto T, Takeshima A, Shinmura K, Shen W, Fukuda K, Sano M. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;62C:24-35.

-
89. Medzhitov R, Janeway CAJR. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*. 1997;9:4-9.
 90. Matzinger P .The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002;296:301-5.
 91. Rosas-Ballina M, Tracey KJ. The neurology of the immune system: neural reflexes regulate immunity. *Neuron*. 2009; 64:28-32.
 92. Timmers L, Sluijter JP, van Keulen JK, Hoefer IE, Nederhoff MG, Goumans MJ, Doevendans PA, van Echteld CJ, Joles JA, Quax PH. Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res*. 2008;102:257-64.
 93. Li Q, Verma IM. NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(10):725-34.
 94. Beinke S, Ley SC. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology. *Biochem J*. 2004;382:393-409.
 95. Siebenlist U, Brown K, Claudio E. Control of lymphocyte development by nuclear factor κ B. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(6):435-45.
 96. Blum A, Yeganesh S. The role of T-lymphocytes subpopulations in acute myocardial infarction. *Eur J Intern Med*. 2003;14:407-10.
 97. Steppich BA, Moog P, Matissek C. Cytokine profiles and T Cell function in acute coronary syndromes. *Atherosclerosis*. 2007;190:443-51.

-
98. Kilic T, Ural D, Ural E. Relation between pro-inflammatory to anti-inflammatory cytokine ratios and long-term prognosis in patients with non- ST elevation acute coronary syndrome. *Heart*. 2006;92:1041-6.
 99. Caligiuri G, Nicoletti A. Lymphocyte responses in acute coronary syndromes: lack of regulation spawns deviant behavior. *Eur Heart J*. 2006;27(21):2485-6.
 100. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self tolerance. *Cell*. 2000;101(5):455-8.
 101. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol*. 2005;6: 331–37.
 102. Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH. Induction of Foxp3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁺ T cells. *J Clin Invest*. 2003;112:1437-43.
 103. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299: 1057-61.
 104. Han SF, Liu P, Zhang W, Bu Lun, Shen M, Li H, Fan YH, Cheng K, Cheng HX, Li CH, Jia GL. The opposite-direction modulation of CD4⁺CD25⁺ Tregs an T helper 1 cells in acute coronary syndromes. *Clin Immunol*. 2007;124:90-7.
 105. Bodi V, Sanchis J, Nunez J. Uncontrolled immune response in acute myocardial infarction unraveling the thread. *Am Heart J*. 2008;156: 1065-73.(Review)

-
106. Beissert S, Schwarz A, Schwarz T. Regulatory T cells. *J Invest Dermatol.* 2006;126:15-24.
 107. Mor A, Luboshits G, Planer D. Altered status of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with acute coronary syndromes. *Eur Heart J.* 2006;27:2530-7.
 108. Li Q, Wang Y, Chen K, Zhou Q, Wei W, Wang Y, Wang Y. The role of oxidized low-density lipoprotein in breaking peripheral Th17/Treg balance in patients with acute coronary syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394:836-42.
 109. Li Q, Wang Y, Wang Y, Zhiu Q, Chen K, Wang YM, Wei W, Wang Y. Distint different sensitivity ot Treg and Th17 cells to Fas-mediated apoptosis signaling in patients with acute coronary syndrome. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(2):297-307.
 110. Hofmann U, Beyersdorf N, Weirather J, Podolskaya A, Bauersachs J, Ertl G, Kerkau T, Frantz S. Activation of CD4⁺T Lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation.* 2012;125:1652-63.
 111. Maisel A, Cesario D, Baird S, Rehman J, Haghghi P, Carter S. Experimental autoimmune myocarditis produced by adoptive transfer of splenocytes after myocardial infarction. *Circ Res.* 1998;82:458-63.
 112. Rose NR, Beisel KW, Herskowitz A. Cardiac myosin and autoimmune myocarditis. *Ciba Found Symp.* 1987;129:3-24.
 113. De Scheerder IK(a), Vandekerckhove J, Robbrechet J. Post-cardiac injury syndrome and an increased humoral immune response against the major contractile proteins (actin and myosin). *Am J Cardiol.* 1985;56(10):631-3.

114. Zhang J, Chen X, Liao YH. Simvastatin regulates myocardial cytokine expression and improves ventricular remodeling in rats after acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2005;19(1):13-21.
115. Pang H, Liao YH, Tu YS. Effect of anti-cardiac myosin antibody on prognosis of patients with acute myocardial infarction. *J Tongji Med Univ.* 2000;20:46-8.
116. Strom TB, Deisseroth A, Morganroth J, Carpenter CB, Merrill JP. Alteration of the cytotoxic action of sensitized lymphocytes by cholinergic agents and activators of adenylate cycles. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 1972;69:2995-9.
117. Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic anti-inflammatory pathway. *J Clin Invest.* 2007;117:289-96.
118. Rangwala F, Dsrisedel RC, Rakhilin S, Ko E, Athuri AB, Fox AP, Salman SS, Green WN. Neuronal alpha-bungarotoxin receptors differ structurally from other nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci.* 1997;17(21):8201-12.
119. Sloan RP, MacCreath H, Tracey KJ, Sidney S, Liu K, Seeman T. RR interval Variability is inversely related to inflammatory markers: The CARDIA Study. *Mol Med.* 2007;13(3-4):178-84.
120. Blalock JE. The immune system as the sixth sense. *J Intern Med.* 2005;257:126-38.
121. Bencherif M, Lippiello PM, Lucas R, Marrero MB. Alpha7 nicotinic receptors as novel therapeutic targets for inflammation-based diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(6):931-49.

-
122. Ulloa L, Doody J, Massague J. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signaling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature*. 1999;397:710-13.
 123. Jenkins BJ, Grail D, Nheu T, Najdovska M, Wang B, Waring P. Hyperactivation of Stat3 in gp130 mutant mice promotes gastric hyperproliferation and desensitizes TGF-beta signaling. *Nat Med*. 2005;11:845-52.
 124. De Jonge WJ. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the JAK2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol*. 2005;6:844-51.
 125. Pena G, Cai B, Liu J, van der Zanden EP, Deitch EA, de Jonge WJ, Ulloa L. Unphosphorylated STAT3 modulates alpha 7 nicotinic receptor signaling and cytokine production in sepsis. *Eur J Immunol*. 2010;40(9):2580-9.
 126. Drisdell RC, Green WN. Neuronal alpha-bungarotoxin receptors are alpha 7 subunit homomers. *J Neurosci*. 2000;20(1):133-38.
 127. Mioni C, Bazzani C, Giuliani D. Activation of an efferent cholinergic pathway produces strong protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Crit Care Med*. 2005;33:2621-28.
 128. Keeler JR, Dunn MA. Pyridostigmine used as a nerve agent pretreatment under wartime conditions. *JAMA*. 1991;266:693-95.
 129. Breyer-Pfaff U, Schumm F. Pyridostigmine kinetics in healthy subjects and patients with myasthenia gravis. *Clin Pharmacol Ther*. 1985;37:495-501.

-
130. Nóbrega AC, dos Reis AF, Moraes RS, Bastos BG, Ferlin EL, Ribeiro JP. Enhancement of heart rate variability by cholinergic stimulation with pyridostigmine in healthy subjects. *Clin Auton Res*. 2001;11:11-17.
 131. Sueta CA. Heart rate variability in chronic heart failure: target for therapy. *Am Heart J*. 2003;146:385-87.
 132. Castro RR, Porphirio G, Serra SM, Nóbrega AC. Cholinergic stimulation with pyridostigmine reduces the QTc interval in coronary artery disease. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35(6):685-9.
 133. Sant'anna ID, de Sousa EB, de Moraes AV, Loures DL, Mesquita ET, da Nóbrega AC. Cardiac function during mental stress: cholinergic modulation with pyridostigmine in healthy subjects. *Clin Sci (Lond)*. 2003;105:161-5.
 134. Raj SR, Vblack BK, Biaggioni I, Harris PA, Robertson D. Acetylcholinesterase inhibition tachycardia in postural tachycardia syndrome. *Circulation*. 2005;111:2734-40.
 135. Mortensen RM. Immune cell modulation of cardiac remodeling. *Circulation*. 2012;125:1597-1600.
 136. De Angelis K, Leirner AA, Irigoyen MC, Cestari IA. Nonstimulated cardiomyoplasty improves hemodynamics in myocardial-infarcted rats. *Artif Organs*. 2001;25(11):939-43.
 137. Akselrod S, Gordob D, Ubel FA. Power spectrum analysis heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science*. 1981;213:220-2.

-
138. Malik M, Camm AJ. Componentes of heart variability; what they really mean an what we really measure. *Am J Cardiol.* 1993;72(11):821-2.
 139. Task Force of the European Society of Cardiology the North American Society of Pacing Electrophysiology. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Eur Heart J.* 1996;17:354-81.
 140. Sahn DJ, De Maria A, Kisslo J, Weyman A. Recomendations regarding quantitation in M-Mode echocardiography; results of a survey of echocardiography measurements. *Circulation.* 1978;56(6): 1072-83.
 141. Li M, Zheng C, Sato T, Kamada T, Sugimachi M, Sunagawa K. Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. *Circulation.* 2004;109:120-24.
 142. Ando M, Katare RG, Kakinuma Y, Zhang D, Yamasaki F, Muramoto K. Efferent vagal nerve stimulation protects heart against ischemia-induced arrhythmias by preserving connexin43 protein. *Circulation.* 2005;112:164-70.
 143. Janszky I, Ericson M, Klekander M, Blom M, Buhlin K, Georgiades A, Ahnve S. Inflammatory markers and heart rate variability in women with coronary heart disease. *J Intern Med.* 2004;256:421-8.
 144. Huston JM, Tracey KJ. The pulse of inflammation: heart rate variability, the cholinergic anti-inflammatory pathway and implications for therapy. *J Intern Med.* 2011;269:45-53.

-
145. Behling A, Moraes RS, Rohde LE, Ferlin EL, Nóbrega AC, Ribeiro JP. Cholinergic stimulation with pyridostigmine reduces ventricular arrhythmia and enhances heart rate variability in heart failure. *Am. Heart J.* 2003;146:494-500.
 146. Serra SM, Costa RV, Teixeira De Castro RR, Xavier SS, Nóbrega AC. Cholinergic stimulation improves autonomic and hemodynamic profile during dynamic exercise in patients with heart failure. *J Card Fail.* 2009;15:124-29.
 147. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res.* 1979;44:503-12.
 148. Matsumoto Y, Park IK, Kohyama K. Matrix metalloproteinase (MMP)-9, but not MMP-2, is involved in the development and progression of C protein-induced myocarditis and subsequent dilated cardiomyopathy. *J Immunol.* 2009;183(7):4773-81.
 149. Varda-Bloom N, Leor J, Ohad DG. Cytotoxic T lymphocytes are activated following myocardial infarction and can recognize and kill normal myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:2141-9.
 150. Liao YH, Tao R, Cheng X. Significance of inflammatory response in myocardium after acute myocardial infarction. *Mol Cardiol Chin.* 2002; 2(3):7-9.
 151. Tracey KJ. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(6): 418-28.
 152. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2010;11:7-13.

-
153. Goser S, Andrassy M, Buss SJ. Cardiac troponin I but not cardiac troponin T induces severe autoimmune inflammation in the myocardium. *Circulation*. 2006;16:1693-702.
 154. Kaya Z, Katus HA, Rose NR. Cardiac troponins and autoimmunity: their role in the pathogenesis of myocarditis and of heart failure. *Clin Immunol*. 2010;134(1):80-8.
 155. Leib C, Goser D, Luthje D, Öttl R, Tretter T, Lasitschk F, Zittrich S, Pfitzer G, Katus HA, Kaya Z. Role of the cholinergic antiinflammatory pathway in murine autoimmune myocarditis. *Circ Res*. 2011;109(2):130-40.
 156. 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.
 157. Nolan RP, Floras JS, Ahmed L, Harvey PJ, Hiscock N, Hendrickx H, Talbot D. Behavioral modification of the cholinergic anti-inflammatory response to C-reactive protein in patients with hypertension. *J Intern Med*. 2012;272(2):161-9.
 158. Tang TT, Yuan J, Zhu ZF, Zhang WC, Xiao H, Xia N, Yan XX, Nie SF, Liu J, Zhou SF, Li JJ, Yao R, Liao MY, Tu X, Liao YH, Cheng X. Regulatory T cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2012;107(1):232.
 159. Roberts R, DeMello V, Sobel BE. Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. *Circulation*. 1976;53(3 Suppl):I204-6.

-
- 160.** Kloner RA, Fishbein MC, Lew H, Maroko PR, Braunwald E. Mummification of the infarcted myocardium by high dose corticosteroids. *Circulation*. 1978;57(1):56-63.
- 161.** Chung ES, Packer M, Lo KH. Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor- α , in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF therapy against congestive heart failure (ATTACH) trial. *Circulation*. 2003;107:3133-40.
- 162.** Mann DL, McMurray JJ, Packer M. Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL). *Circulation*. 2004;109:1594-602.
- 163.** Liao YH, Cheng X. Autoimmunity in myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2006;112(1):21-26.
- 164.** Matsumoto K, Ogawa M. Regulatory T Lymphocytes attenuate myocardial infarction induced ventricular remodeling in mice. *Int Heart J*. 2011;52:382-87.
- 165.** Curato C, Slavic S, Dong J, Skorska A, Altarache-Xifró W, Miteva K, Kaschina E, Thiel A, Imboden H, Wang J, Steckelings U, Steinhoff G, Unger T, Li J. Identification of noncytotoxic and IL-10-producing CD8⁺ AT2R⁺ T Cell population in response to ischemic heart injury. *J. Immunol*. 2010;185:6286-93.
- 166.** Dobaczewski M, Bujak M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. *Am J. Pathol*. 2010;176(5):2177-87.

-
167. Schwartz PJ, De Ferrari GM. Vagal stimulation for heart failure: background and first in-man study. *Rhythm*. 2009;6:S76-S81.
 168. Desai MY, Watanabe MA, Laddu AA, Hauptman. Pharmacologic modulation of parasympathetic activity in heart failure. *Heart Fail Rev*. 2011;16:179-193.
 169. De Ferrari GM, Schwartz PJ. Vagus nerve stimulation: from pré-clinical to clinical application: challenges and future directions. *Heart Fail Rev*. 2011;16:195-203.
 170. De Ferrari GM, Crijns HJGM, Borggrefe M. Chronic vagus nerve stimulation: a new and promising therapeutic approach for chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2011;32:847-55.
 171. Hauptman PJ, Schwartz PJ, Gold MR. Rationale and study design of the increase of vagal tone in heart failure: INOVATE-HF. *Am Heart J*. 2012;163:954-62.
 172. Calvillo L, Vanoli E, Andreoli E, Besana A, Omodeo E, Gnechi M, Zerbi P, Vago G, Busca G, Schwartz PJ. Vagal stimulation, through its nicotinic action, limits infarct size and the inflammatory response to myocardial ischemia and reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011;58(5):500-7.
 173. Olshansky B, Sabbah HN, Hauptman PJ, Colucci WS. Parasympathetic nervous system and heart failure: pathophysiology and potential implications for therapy. *Circulation*. 2008;118:863-71.
 174. Lichtman AH. The heart of the matter. Protection of the myocardium from T cells. *J Autoimmun*. 2013;45:90-6.

175. Anzai T. Post-infarction inflammation and left ventricular remodeling. Review. *Circ J.* 2013;77:580-7.
176. Sanyal SN, Wada T, Yamabe M, Anai H, Miyamoto S, Shimada T, Ono K. Cardiac autonomic nerve abnormalities in chronic heart failure are associated with presynaptic vagal nerve degeneration. *Pathophysiology.* 2012;19:253-60.