

ELISABETE REGINA BÓF RAMOS

**TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA A ANTÍGENOS CARDÍACOS
COMO ABORDAGEM TERAPÊUTICA NO REPARO
TECIDUAL MIOCÁRDICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.
Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

FLORIANÓPOLIS
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ramos, Elisabete Regina Bóf
Tolerância imunológica a antígenos cardíacos como abordagem
terapêutica no reparo tecidual miocárdico / Elisabete
Regina Bóf Ramos ; orientador, Jamil Assreuy -
Florianópolis, SC, 2015.
111 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Infarto miocárdico. 3. Tolerância
oral. 4. Antígenos cardíacos. 5. curvas pressão-volume. I.
Assreuy, Jamil. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III.
Título.

A todos que já sofreram um infarto agudo do miocárdio, e suas famílias.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Jamil, por ter sido extremamente compreensivo em todas as situações que vivi durante meu processo de doutoramento, dentro e fora do laboratório. Agradeço por todos os ensinamentos que me foram dados, que também não se restringiram a minha formação acadêmica.

Ao meu marido e colega de laboratório Gustavo, por acreditar em mim e me incentivar sempre. Agradeço pela colaboração fundamental e decisiva para realização deste trabalho.

À minha filha Cecília, por seu amor, carinho e compreensão. Este trabalho nasceu logo após o seu nascimento, e cresceu com você!

Aos meus pais, irmã e sobrinho, pelo amor, carinho e apoio incondicional.

Aos amigos e colegas de departamento Edir e Maíra, por estarem sempre dispostos a ajudar, e cuja colaboração foi essencial para realização deste trabalho.

Ao professor José Eduardo, com quem iniciei meu doutoramento, e que embora não tenhamos seguido juntos até o final deste processo, sou grata pelos anos de convivência.

Aos demais colegas do Laboratório do Óxido Nítrico e do Laboratório de Doenças Cardiovasculares, pelos momentos compartilhados e por criarem um ambiente favorável ao crescimento pessoal e científico.

Ao apoio financeiro da Capes, CNPq e FAPESC.

"É preciso fazer da interrupção um caminho novo;
fazer da queda, um passo de dança; do medo, uma
escada; do sonho, uma ponte; da procura, um
encontro." (Fernando Pessoa)

RESUMO

Após um episódio de infarto do miocárdio, cardiomiócitos necrosados liberam componentes intracelulares os quais se configuram como antígenos, e desencadeiam assim, uma resposta autoimune contra o tecido cardíaco. Em um trabalho prévio realizado por nosso grupo encontramos que a tolerância imunológica aos antígenos cardíacos pode ser reforçada por meio do tratamento oral com proteínas cardíacas, e parece ser benéfica ao processo de reparo tecidual e função cardíaca após a indução de isquemia. Desta forma, o principal objetivo deste trabalho foi estudar em maiores detalhes estas observações e ainda, caracterizar o fenótipo dos leucócitos presentes no infiltrado celular inflamatório. Lesões cardíacas semelhantes ao infarto foram induzidas em ratos *Wistar* machos (grupo ISO) através da injeção de altas doses de isoproterenol (150 mg/Kg, em dois dias consecutivos). A tolerância imunológica aos antígenos cardíacos foi desenvolvida por meio da exposição oral aos componentes do coração 7 dias antes da indução da lesão miocárdica (grupo TOL+ISO). Animais *naïve* foram usados como controles não-infartados (grupo CTR). Com a finalidade de se acessar a função cardíaca e o processo inflamatório que tomou parte após a indução da lesão isquêmica, foram realizadas avaliação hemodinâmica e análise imunohistoquímica. Observamos que, enquanto os animais do grupo ISO apresentaram um proeminente dano sistólico e diastólico cardíaco, os animais do grupo TOL+ISO apresentaram fração de ejeção preservada tanto 3 dias após a indução da lesão miocárdica isquêmica (CTR $73,4 \pm 2,8$; ISO $44,6 \pm 6,3$; TOL+ISO $74,3 \pm 4,4$; $P < 0,05$ entre o grupo CTR e o grupo ISO), quanto 15 dias após (CTR $73,4 \pm 2,8$; ISO $53,6 \pm 8,8$; TOL+ISO $66,6 \pm 4,1$; $P < 0,05$ entre grupo CTR e grupo ISO). A análise imunohistoquímica dos níveis de expressão de IL-10, arginase-1, NOS-2 e fosfo-p65 revelou que os animais tornados tolerantes aos antígenos cardíacos (TOL+ISO) são capazes de mobilizar a resposta anti-inflamatória de forma antecipada e mais pronunciada, quando comparado aos animais do grupo ISO. Em conjunto, nossos dados sugerem que a tolerância oral aos antígenos cardíacos pode ser capaz de melhorar o processo de reparo tecidual após lesão isquêmica, uma vez que acelerou o processo de resolução da inflamação, e que isso se correlacionou com o melhor desempenho cardíaco global.

Palavras-chave: Infarto miocárdico; tolerância oral. antígenos cardíacos; curvas pressão-volume; fenótipo leucocitário.

ABSTRACT

After a myocardial infarction episode, necrotic cardiomyocytes can release antigens that trigger autoimmunity phenomena against the cardiac tissue. In a previous work we found that the reinforcing immunological tolerance to such cardiac antigens might benefit myocardial healing and function after isoproterenol-induced damage. Thus, the main objective of the present study was to further address those observations, and characterize the phenotype of infiltrating leukocytes. Infarction-like myocardial lesions were induced in male *Wistar* rats (ISO group) through the injection of high doses of isoproterenol (150 mg/kg, two consecutive days). Immunological tolerance to cardiac antigens was developed by means of oral exposure to cardiac antigens 7 days before isoproterenol-induced myocardial lesions (TOL+ISO group). Naïve animals were used as non-infarcted control (CTR group). Hemodynamics and immunohistochemistry analysis were performed to assess myocardial function and inflammation. We found that while ISO-treated animals presented systolic and diastolic impairment, TOL+ISO animals presented preserved ejection fraction at 3 d (CTRL 73.4 ± 2.8 ; ISO 44.6 ± 6.3 ; TOL+ISO 74.3 ± 4.4 ; $P < 0.05$ between CTRL and ISO) and 15 d (CTRL 73.4 ± 2.8 ; ISO 53.6 ± 8.8 ; TOL+ISO 66.6 ± 4.1 ; $P < 0.05$ between CTRL and ISO) post myocardial lesion induction. Immunohistochemical analysis of IL-10, arginase-1, NOS-2 and phospho-p65 expression levels revealed that animals tolerant to cardiac antigens mobilized an earlier and stronger anti-inflammatory response as compared to animals from the ISO group. Altogether, these findings suggest that oral tolerance to cardiac antigens might improve myocardial healing by means of accelerating the inflammation resolution process, and that correlated with a better overall cardiac functionality.

Keywords: Myocardial infarction; oral tolerance; cardiac antigens; PV-loop; monocyte subsets.

LISTA DE SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CTR	Controle
dP/dtmax	Pico de pressão intraventricular positiva
desenvolvida ao longo do tempo	
dP/dtmin	Pico de pressão intraventricular negativa
desenvolvida ao longo do tempo	
Ea	Elastância arterial
FE	Fração de ejeção
I.M.	Intra-muscular
iECA	Inibidor da enzima conversora de
angiotensina	
IL-10	Interleucina 10
IM	Infarto do miocárdio
ISO	Isoproterenol
NOS-2	Óxido nítrico sintase-2
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Salina tamponada com fosfato
PDF	Pressão diastólica final
PSF	Pressão sistólica final
Tau	Constante de tempo do relaxamento
isovolumétrico	
TC	Trabalho cardíaco
TGF β	Fator transformador do crescimento β
TNF	Fator de necrose tumoral
TOL+ISSO	Animais submetidos ao protocolo de
tolerância oral a antígenos cardíacos e desafiados com	
isoprenalina	
VDF	Volume diastólico final
VE	Volume de ejeção
VSF	Volume sistólico final

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratificação do risco cardiovascular em quatro categorias (segundo a Sociedade Européia de Cardiologia).....	27
Figura 2. Relação entre o efeito cardiotóxico e letal de diferentes doses das catecolaminas, noradrenalina, adrenalina e isoprenalina.	30
Figura 3. Integração da cinética de alterações morfológicas, funcionais e neuroendócrinas decorrentes do IM, bem como a abordagem terapêutica atualmente preconizada.	37
Figura 4. A "tolerância oral".	48
Figura 5. A relação entre atividade imunológica e o reparo tecidual cardíaco pós-lesão isquêmica.	50
Figura 6. Esquema representativo do procedimento de cateterismo do ventrículo esquerdo a partir da artéria carótida direita por meio do cateter de pressão-volume (SPR-901, Millar Instruments Inc., Houston, TX, EUA).	58
Figura 7. Registro típico das medidas de pressão e volume intraventricular cardíaco obtidos a partir de um animal naïve.	60
Figura 8. Curva representativa de relação pressão-volume durante o ciclo cardíaco.	61
Figura 9. Parâmetros hemodinâmicos basais medidos 3 dias após a indução da lesão cardíaca do tipo infarto.	66
Figura 10. Parâmetros hemodinâmicos medidos após a estimulação com dobutamina, 3 dias após a indução da lesão isquêmica.	69
Figura 11. Parâmetros hemodinâmicos basais medidos 15 dias após a indução da lesão isquêmica.	73
Figura 12. Parâmetros hemodinâmicos medidos após a estimulação com dobutamina, 15 dias após a indução da lesão cardíaca do tipo infarto. .	74
Figura 13. Fotos representativas dos principais achados imuno-histoquímicos.	77
Figura 14. Nível de expressão de mediadores pró-inflamatórios no coração.	78
Figura 15. Nível de expressão de mediadores anti-inflamatórios no coração.	80
Figura 16. Análise da correlação entre fração de ejeção (%) e expressão dos mediadores inflamatórios 3 dias após a indução da lesão miocárdica.	82
Figura 17. Resumo gráfico dos principais achados.	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros hemodinâmicos: valores basais.....	67
Tabela 2. Parâmetros hemodinâmicos: valores após estimulação com dobutamina 30 nmol/Kg (apresentados como Δ da resposta).....	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Fatores que afetam negativamente o prognóstico após o IM.	44
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	INFARTO DO MIOCÁRDIO E FALÊNCIA CARDÍACA - DO LEITO A BANCADA	25
1.1.1	No leito: definições, epidemiologia e etiologia	25
1.1.2	Na bancada: modelos experimentais para o estudo do infarto miocárdico	27
1.2	FISIOPATOLOGIA DO INFARTO DO MIOCÁRDIO E DA FALÊNCIA CARDÍACA	30
1.2.1	Alterações bioquímicas e morfológicas	31
1.2.2	Alterações neuroendócrinas	33
1.2.3	Alterações funcionais	33
1.3	TERAPÊUTICA UTILIZADA NO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO E NA FALÊNCIA CARDÍACA	38
1.3.1	Em casos de emergência	38
1.3.2	Principais terapias após hospitalização	39
1.3.3	A lacuna terapêutica - o reparo tecidual	42
1.4	CORAÇÃO ALÉM DA CARDIOLOGIA	42
1.5	DA BANCADA AO LEITO - NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS VOLTADAS PARA O REPARO DA LESÃO MIOCÁRDICA ISQUÊMICA	45
1.5.1	Tolerância imunológica	46
1.6	PROPOSTA DE TRABALHO	51
2	OBJETIVOS	53
2.1	GERAL	53
2.2	ESPECIFICOS	53
3	MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1	ANIMAIS	55
3.2	MODELO EXPERIMENTAL	55
3.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS	55
3.3.1	Preparo de extrato cardíaco	56
3.3.2	Protocolo de tolerância oral	56
3.4	PARÂMETROS AVALIADOS	56
3.4.1	Parâmetros funcionais cardíacos	56
3.4.1.1	Análise in vivo da função cardíaca por meio da avaliação das relações de pressão e volume intraventricular a cada ciclo cardíaco	56
3.4.2	Parâmetros imunológicos	62

3.4.2.1	Obtenção do material biológico para a técnica de imunohistoquímica.....	62
3.4.2.2	Técnica de imunohistoquímica	62
3.5	COMPOSTOS E REAGENTES	64
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
4	RESULTADOS	65
4.1	PARÂMETROS FUNCIONAIS CARDÍACOS.....	65
4.2	PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS	76
5	DISCUSSÃO.....	85
5.1	CONSIDERAÇÕES SOBRE O MODELO EXPERIMENTAL.....	85
5.2	ABORDAGEM TERAPÊUTICA PREVENTIVA: TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA A ANTÍGENOS CARDÍACOS....	87
5.2.1	Importância dos linfócitos no reparo tecidual cardíaco após lesão isquêmica.....	87
5.2.2	Validação do protocolo de tolerância oral	90
5.2.3	Efeitos da tolerância oral a antígenos cardíacos sobre o reparo do miocárdio	90
6	CONCLUSÕES.....	97
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFARTO DO MIOCÁRDIO E FALÊNCIA CARDÍACA - DO LEITO A BANCADA

1.1.1 No leito: definições, epidemiologia e etiologia

O infarto do miocárdio (IM) é a principal causa de morte e incapacidade física em todo o mundo, constituindo assim, um dos principais problemas de saúde. Estima-se que esta condição é responsável pelo óbito de cerca de 7 milhões de pessoas por ano em todo o mundo (THYGESEN *et al.*, 2012). O Brasil segue uma epidemiologia comum a outros países de cultura ocidental, sendo que aproximadamente 32% de todas as mortes no país podem ser atribuídas a distúrbios cardiovasculares (POLANCZYK e RIBEIRO, 2009).

O IM é definido como morte celular cardíaca decorrente de isquemia prolongada. Essa isquemia, na grande maioria dos casos, aparece secundariamente a três diferentes processos: formação de placa aterosclerótica, desenvolvimento de trombose ou ocorrência de vasoconstrição patológica (vasoespasmos). Cada um desses fenômenos, ao atingir determinado grau de intensidade, pode provocar o aparecimento de uma síndrome aguda isquêmica do músculo cardíaco, caracterizada inicialmente por angina de peito e que, se mais severa e demorada, pode levar à necrose de áreas extensas do músculo cardíaco, caracterizando o infarto agudo do miocárdio (revisto em TIBIRIÇÁ, 2001; THYGESEN *et al.*, 2012).

Nos primeiros minutos após sua ocorrência, a principal consequência do IM é o comprometimento importante da funcionalidade cardíaca, reduzindo consideravelmente o débito cardíaco e aumentando a pressão venosa (especialmente no pulmão), levando muitos indivíduos à morte. Por outro lado, nos pacientes que sobrevivem ao infarto agudo do miocárdio, a evolução do quadro normalmente segue com um reparo tecidual excessivamente fibrótico, promovendo importantes mudanças na estrutura cardíaca, conduzindo, assim, ao estabelecimento da falência cardíaca (THYGESEN *et al.*, 2012). A falência cardíaca é uma condição bastante limitante, com prognóstico grave. Estima-se que nos países desenvolvidos aproximadamente 1-2% da população adulta apresenta esta patologia, sendo que a prevalência pode chegar a 10% nas pessoas com 70 anos ou mais (McMURRAY *et al.*, 2012).

No que diz respeito aos fatores de risco, é bem estabelecido que doenças como diabetes, dislipidemias, hipertensão, disfunção de órgãos

decorrente de má perfusão, episódios prévios de doença cardiovascular ou renal, e fatores como índice de massa corporal elevado, hábito de fumar e estresse, contribuem de forma significativa com o aparecimento de (novas) doenças cardiovasculares, como é o caso do IM. Sabe-se ainda, que alguns outros fatores são importantes, como idade, sexo e histórico familiar (KANNEL, 2000).

Há alguns anos a Sociedade Europeia de Cardiologia tem preconizado que o diagnóstico e a escolha dos métodos para o tratamento das doenças cardiovasculares devem ser baseados na quantificação total dos fatores de risco (Figura 1). Esse conceito é baseado no fato de que a grande maioria dos hipertensos apresenta, além da elevação na pressão arterial, outros fatores de risco cardiovascular associados (THOMAS, 2001). Ademais, fatores de riscos concomitantemente presentes em um paciente podem promover um risco cardiovascular total que é maior do que a soma dos seus componentes individuais. Um exemplo disso é que a elevação da pressão arterial é maior em pacientes que apresentam alterações no metabolismo da glicose e de lipídeos do que em pacientes que não apresentam essas doenças associadas (MANCIA *et al.*, 2006; MANCIA *et al.*, 2007).

Com base nessa integração de fatores de risco, preconiza-se como meta manter os pacientes dentro dos limites da linha tracejada indicada na Figura 1, de modo que nem sempre a abordagem farmacológica é a melhor opção para se diminuir o risco cardiovascular.

Figura 1. Estratificação do risco cardiovascular em quatro categorias (segundo a Sociedade Europeia de Cardiologia).

Fatores de risco adicionados	Pressão arterial (mm Hg)				
	Normal PAS 120-129 PAD 80-84	Normal alta PAS 130-139 PAD 85-89	Hipertensão I PAS 140-159 ou PAD 90-99	Hipertensão II PAS 160-179 ou PAD 100-109	Hipertensão III PAS \geq 180 ou PAD \geq 110
-	Risco padrão	Risco padrão	Baixo/Risco adicionado	Risco moderado adicionado	Alto risco adicionado
1-2	Baixo Risco adicionado	Baixo Risco adicionado	Risco moderado adicionado	Risco moderado adicionado	Risco muito alto adicionado
\geq 3 ou diabetes	Risco moderado adicionado	Alto risco adicionado	Alto risco adicionado	Alto risco adicionado	Risco muito alto adicionado
Doença renal ou cardiovascular	Risco muito alto adicionado	Risco muito alto adicionado	Risco muito alto adicionado	Risco muito alto adicionado	Risco muito alto adicionado

PAS indica pressão arterial sistólica e PAD indica pressão arterial diastólica. As categorias, baixo, moderado, alto ou muito alto são estratificadas com base na probabilidade de incidência de eventos (fatais ou não) em um período de 10 anos. O termo “adicionado” refere-se a faixas de incremento sobre o risco cardiovascular padrão. Os fatores de risco estão mencionados no texto. Adaptado de MANCIA *et al.*, 2007.

1.1.2 Na bancada: modelos experimentais para o estudo do infarto miocárdico

Ao longo dos anos tem-se tentado estabelecer modelos animais de isquemia e lesões cardíacas do tipo infarto miocárdico que apresentem analogia à doença humana. Nesse sentido, atualmente são três os modelos mais utilizados: ligação/oclusão da artéria coronária, modelo farmacológico através da administração de isoproterenol e criolesão.

Com relação ao modelo de ligadura da artéria coronária, normalmente se obstrui o ramo descendente anterior esquerdo, sendo que esta ligadura pode ser feita de forma temporária (isquemia e reperfusão) ou permanente. Este modelo apresenta grande similaridade ao infarto agudo do miocárdio em humanos, especialmente no que diz respeito à evolução clínica. Os animais apresentam grandes áreas de necrose, lesão tecidual e disfunção ventricular, muito bem mostrado por Pfeffer e colaboradores (1979). No entanto, este modelo está associado a um número considerável de desvantagens: dificuldade de execução da técnica, a qual requer alguns instrumentos específicos e um

experimentador muito bem treinado; alta taxa de mortalidade, variando na literatura entre 10-70% e, de modo particular, dificuldade de reprodução da técnica, visto que a extensão e homogeneidade da lesão dependem do sistema de circulação colateral, o qual varia consideravelmente mesmo entre indivíduos da mesma espécie (DE SOUZA, 2005).

No modelo de criolesão o dano cardíaco é causado por hipotermia local, a qual normalmente é induzida com uma haste metálica congelada em nitrogênio líquido. Ainda que não seja um modelo de IM fisiológico, o padrão de cicatrização celular tem muitas similaridades ao que se observa na clínica (JENSEN *et al.*, 1987). Quando comparado com o modelo de ligadura da artéria coronária, este modelo apresenta como principal vantagem a obtenção de uma amostra homogênea onde os animais apresentam lesões com área e proporções previsíveis, além de menor variabilidade na disfunção miocárdica (LI *et al.*, 1996). Por outro lado, se algumas variáveis, como o tipo de haste e tempo e número de contatos haste-tecido, não estiverem bem padronizados, corre-se o risco dos animais não desenvolverem lesão pronunciada, ou ainda, parcela dos que apresentarem curarem-se sem desenvolver fibrose ou aneurisma de ponta de ventrículo, como documentado por Monnet e Chachques (2005).

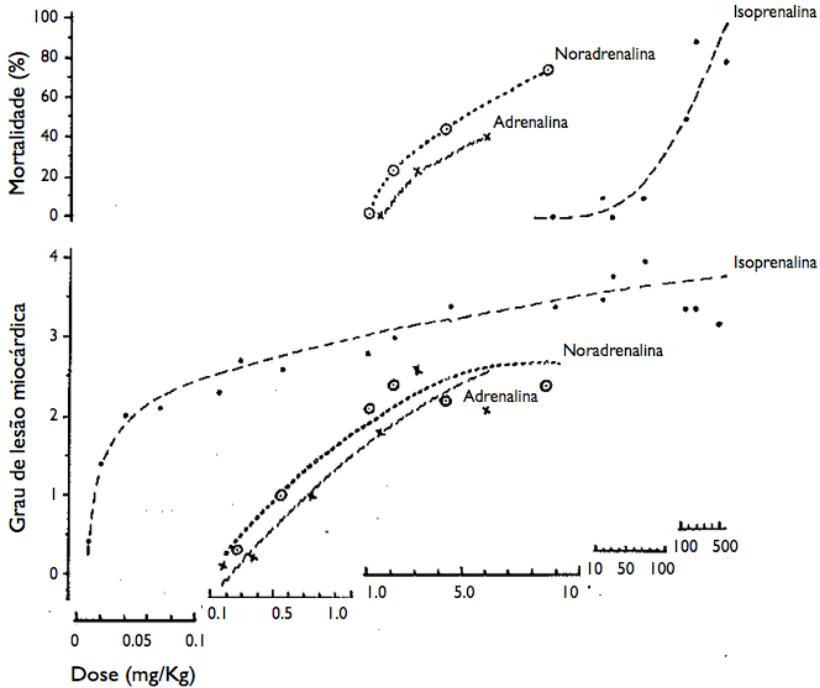
O uso de isoproterenol (ISO) para indução de lesão cardíaca semelhante ao infarto foi inicialmente descrito por Rona e colaboradores em 1959. O principal mecanismo através do qual a administração de altas doses de isoproterenol promove lesão miocárdica deve-se as suas propriedades farmacológicas. Este composto atua seletivamente em receptores β -adrenérgicos, produzindo considerável efeito cronotrópico e inotrópico positivo no coração (via estimulação de receptores β_1 -adrenérgicos), ao mesmo tempo em que produz importante relaxamento dos vasos sanguíneos (via estimulação de receptores β_2 -adrenérgicos) (GOODMAN *et al.*, 2006). Desta forma, ao aumentar o trabalho cardíaco e diminuir o aporte sanguíneo ao coração por conta da ativação dos receptores, o isoproterenol cria um balanço desfavorável entre a demanda e a oferta de oxigênio, causando isquemia cardíaca. Além disso, o aumento da funcionalidade cardíaca esgota as reservas de energia das células contráteis, ocasionando importantes mudanças bioquímicas e estruturais (CAMPOS, 2008).

Como pode ser observado na Figura 2, quando comparado à noradrenalina ou à adrenalina, o isoproterenol é mais potente e mais eficaz em causar lesões miocárdicas de alto grau de severidade. Ainda, fica evidente que a lesão cardíaca induzida pelo isoproterenol demanda

ambas as ações cardíacas e vasculares desta droga, visto que a adrenalina, que induz efeitos cardíacos semelhantes, não produz os efeitos vasculares e não é capaz de gerar as mesmas lesões miocárdicas. Também é importante mencionar, que doses de até 150 mg/Kg de isoproterenol não causam lesões significativas em outros órgãos que não o coração, de modo que a mortalidade observada decorre essencialmente da lesão miocárdica. Por outro lado, a mortalidade induzida pela administração de altas doses de noradrenalina e adrenalina ocorre devido à formação de importante edema pulmonar decorrente da excessiva vasoconstrição produzida nesse leito por essas drogas (via estimulação de receptores α_1 -adrenérgicos) (RONA *et al.*, 1963).

As principais vantagens deste modelo são a facilidade de execução e homogeneidade da amostra. No entanto, a principal desvantagem é que, diferentemente dos outros modelos mencionados, a isquemia produzida pela administração de isoproterenol não apresenta uma localização focal, difundindo-se em boa parte do ventrículo esquerdo (incluindo o ápice do coração e septo interventricular) (RONA *et al.*, 1959).

Figura 2. Relação entre o efeito cardiotoxico e letal de diferentes doses das catecolaminas, noradrenalina, adrenalina e isoprenalina.



A lesão cardíaca foi avaliada com base nos aspectos histopatológicos do tecido. Cada ponto representa a compilação dos dados obtidos a partir de 10 diferentes ratos. Adaptado de RONA *et al.*, 1963.

1.2 FISIOPATOLOGIA DO INFARTO DO MIOCÁRDIO E DA FALÊNCIA CARDÍACA

No infarto agudo do miocárdio, a necrose de cardiomiócitos provocada pela isquemia, associada à presença de uma reação inflamatória local, acarretam sério prejuízo funcional cardíaco. Como consequência disso, uma série de alterações neuroendócrinas compensatórias desempenha um papel importante na manutenção do débito cardíaco neste primeiro momento. No entanto, ressalta-se que durante o reparo desta lesão ocorre substituição do tecido original (contrátil) por um tecido cicatricial (FRANGOGIANNIS, 2008).

Em uma parcela substancial de pacientes com IM esses mecanismos reparadores induzem profundas mudanças estruturais e

funcionais, não apenas na área infartada, mas também em outras regiões do coração. Esses pacientes apresentam um adelgaçamento das paredes ventriculares, expansão da zona de infarto, hipertrofia patológica dos cardiomiócitos, apoptose e remodelamento da matriz extracelular em zonas remotas, tudo isso em um processo que perdura por vários meses (VAN DER LAAN *et al.*, 2012).

Esses mecanismos subjacentes ao reparo, que induzem alterações na forma, massa, volume e função ventricular, terminam por criar um remodelamento cardíaco adverso. Ainda que essas mudanças pareçam fisiológicas e adaptativas em um primeiro momento, cronicamente elas estão associadas ao desenvolvimento da falência cardíaca. As próximas seções serão dedicadas à exposição dessas alterações neuroendócrinas, funcionais, e morfológicas da transição infarto-falência cardíaca (ver Figura 3, a qual integra os conhecimentos das diferentes áreas sobre este tema).

1.2.1 Alterações bioquímicas e morfológicas

Em condições anaeróbicas, o coração de mamíferos não pode produzir energia o suficiente para manter seus processos celulares essenciais. Assim, um suprimento constante de oxigênio é indispensável para manutenção da função e da viabilidade dos cardiomiócitos. Após uma isquemia miocárdica, ocorre decréscimo na oferta de oxigênio para as células cardíacas e, subsequentemente, diminuição na formação de ATP (adenosina trifosfato). Neste caso, a depleção de ATP gera redução na atividade da bomba de sódio com perda de potássio intracelular, influxo de sódio e água e edema celular (FRANGOIANNIS, 2008).

Os processos de exaustão do metabolismo aeróbico, depleção de ATP e acúmulo de produtos do metabolismo anaeróbico, ocorrem 10 segundos após a oclusão de uma artéria coronária. Alterações morfológicas reversíveis nos cardiomiócitos podem ser observadas minutos após o estabelecimento da isquemia miocárdica, enquanto que as lesões irreversíveis (*e.g.* rompimento do sarcolema) se desenvolvem após 20-40 minutos de uma isquemia sustentada (ERTL e FRANTZ, 2005; FRANGOIANNIS, 2008).

Dependendo da dimensão dessas lesões isquêmicas do miocárdio, o infarto pode ser evidenciado eletrocardiograficamente de maneiras diferentes. Uma obstrução coronariana total, que promove lesões necróticas transmuralis, resulta em uma característica elevação no segmento ST (período refratário e repolarização ventricular), ao passo que obstruções coronarianas apenas parciais, com subsequente lesão

confinada apenas ao compartimento subendocárdico, não o fazem. Desse modo, os episódios de infarto agudo miocárdico são divididos clinicamente entre eventos com elevação do segmento eletrocardiográfico ST (do inglês, STEMI – *ST elevation myocardial infarction*) e sem elevação (do inglês, NSTEMI - no-STEMI), sendo os primeiros mais graves e com pior prognóstico (STEG *et al.*; 2012).

As células que entram em morte celular por necrose liberam, em função desse processo, seus conteúdos intracelulares (o que alguns autores denominam de “padrões moleculares associados ao perigo”), que juntamente com a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, iniciam uma resposta inflamatória e de reparo tecidual que pode ser dividida em 3 fases sequenciais que se sobrepõem: a fase inflamatória, a fase proliferativa (reparo propriamente dito) e a fase de maturação (VAN DER LAAN *et al.*, 2012).

Na fase inflamatória, neutrófilos e monócitos, atraídos para a área infartada por quimiocinas, fatores do complemento e outros mediadores, removem células mortas e promovem a degradação da matriz extracelular através da ativação de metaloproteinasas. Por um lado, essa resposta inflamatória é importante porque, ao remover os restos celulares, evita a formação de trombos e ainda abre caminho para a fase posterior, que é de renovação tecidual (NAHRENDORF *et al.*, 2007; HOFMANN *et al.*, 2012). Por outro lado, porém, uma resposta inflamatória exacerbada ou mal direcionada muitas vezes promove morte de um número ainda maior de cardiomiócitos, expandindo assim a zona de infarto (FRANGOGIANNIS, 2008; VAN DER LAAN *et al.*, 2012).

Ao término da fase inflamatória, os monócitos/macrófagos produzem citocinas e fatores do crescimento, como interleucina 10 (IL-10) e fator transformador do crescimento β (TGF β), responsáveis por reprimir os sinais inflamatórios e regular a formação de um tecido de granulação durante a fase proliferativa (momento em que se inicia a reconstrução do tecido). Na fase proliferativa, novos vasos sanguíneos são formados e os fibroblastos produzem uma nova matriz extracelular. Por fim, na fase de maturação a matriz extracelular é remodelada, os fibroblastos e as células vasculares sofrem apoptose e a cicatriz é formada através da maturação do colágeno (ERTL e FRANTZ, 2005; VAN DER LAAN *et al.*, 2012).

É importante mencionar que estudos mostraram que o remodelamento cardíaco adverso que ocorre nos momentos crônicos é determinado pelo modo como se dá o processo inflamatório e de reparo na fase inicial do pós-infarto (ERTL e FRANTZ, 2005;

FRANGOIANNIS, 2008). Essa relação entre a qualidade do reparo e a falência cardíaca será discutida a seguir.

1.2.2 Alterações neuroendócrinas

Após a lesão miocárdica aguda, a queda no débito cardíaco deflagra uma importante ativação neuronal e endócrina compensatória. Essa ativação envolve de maneira mais evidente o sistema nervoso autônomo simpático e o sistema renina-angiotensina-aldosterona.

Inicialmente, os barorreceptores são ativados, em resposta à diminuição abrupta da pressão arterial. Segundos depois ocorre intensa descarga simpática no coração, ao mesmo tempo em que o sistema nervoso parassimpático é inibido. Além do coração, a descarga simpática é dirigida para rins, vasos sanguíneos periféricos e glândulas suprarrenais. A descarga simpática, ao aumentar a força e frequência cardíaca e facilitar o retorno venoso, é capaz de compensar parcial e temporariamente, a queda do débito cardíaco, como pode ser observado na Figura 3, Painel D (McMURRAY, 2010).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona também é ativado precocemente após o infarto agudo do miocárdio. Não apenas a redução do fluxo sanguíneo renal, como a própria ativação do eixo simpatorrenal, levam à secreção de renina. Como consequência, ocorre o aumento dos níveis plasmáticos de angiotensina II e aldosterona, determinando retenção hidrossalina pelos túbulos renais e aumentando a excreção de potássio. Do ponto de vista fisiológico, essa resposta contribui para produzir níveis volêmicos mais elevados, facilitando a manutenção de uma perfusão periférica adequada (SHAH e MANN, 2011; TIBIRIÇÁ, 2001).

Foi observado que a intensidade da ativação neuroendócrina está diretamente relacionada à gravidade do infarto e, conseqüentemente, à morbidade e à mortalidade. Em grande parte dos pacientes, essa ativação é modesta e transitória, regredindo após uma ou duas semanas de evolução. No entanto, nos pacientes que apresentam dano miocárdico mais extenso ou que evoluem para falência cardíaca, a ativação neuroendócrina é persistente e, portanto, deletéria ao organismo (McMURRAY *et al.*, 2012).

1.2.3 Alterações funcionais

As alterações funcionais cardíacas decorrentes do IM podem ser evidenciadas através de exames eletrocardiográficos, ecocardiográficos,

de ressonância magnética e exames bioquímicos. Ainda, outra forma de se observar essas alterações, tanto em humanos, quanto em animais de experimentação, é através do posicionamento intraventricular de um cateter contendo transdutores de condutância, o qual permite a avaliação da relação entre as variações de pressão e volume durante o ciclo cardíaco (SHIOURA, *et al.*, 2007) (Figura 3, painel C). Por meio dessa abordagem, uma das observações mais frequentes é a presença de disfunção sistólica ou disfunção diastólica pós-IM. Essas disfunções podem acometer o coração de forma uni ou bilateral (McMURRAY *et al.*, 2012; GEHLBACH e GEPPERT, 2004).

Na disfunção sistólica observa-se dilatação ventricular associada à perda da capacidade contrátil. Do ponto de vista funcional, o prejuízo na contração ventricular compromete o mecanismo de Frank-Starling, resultando na diminuição do volume sanguíneo que passa pelo ventrículo a cada ciclo cardíaco (volume de ejeção). Na tentativa de compensar essa redução de volume, quando possível, o organismo aciona mecanismos responsáveis por aumentar a pré-carga (CHATTERJEE e MASSIE, 2007).

Ainda com relação à disfunção sistólica, ocorrem aumentos dos volumes sistólico e diastólico finais, sendo que o aumento do volume sistólico final é mais significativo. A redução do volume sanguíneo que passa pelo ventrículo a cada ciclo cardíaco, associada ao aumento do volume diastólico final, resulta na redução da fração de ejeção ventricular, comprometendo assim o aporte de oxigênio e nutrientes para o próprio coração e para os demais tecidos. No coração com disfunção sistólica, a ejeção de sangue é de 40-50%, enquanto que no coração normal a ejeção chega a pelo menos 60% do volume sanguíneo encontrado na câmara ventricular. O trabalho cardíaco também se encontra diminuído (KONSTAM, 2003).

Uma importante consequência da disfunção sistólica é o aumento da pressão diastólica final. Quando o ventrículo esquerdo está envolvido, esta alteração leva ao aumento da pressão no átrio esquerdo, e conseqüentemente, da pressão venosa pulmonar que, em última instância, pode provocar congestão pulmonar e edema, importantes causas de morte. Quando a disfunção sistólica acomete o ventrículo direito, o aumento da pressão diastólica final gera o aumento de pressão no átrio direito e na vasculatura venosa sistêmica, podendo levar ao edema periférico (CHATTERJEE e MASSIE, 2007; CHATTERJEE, 2012).

Na disfunção diastólica é o processo de enchimento ventricular que está comprometido, visto que ocorre hipertrofia das paredes

ventriculares com consequente diminuição do espaço dentro das câmaras. Além disso, o processo de relaxamento ventricular também se encontra prejudicado. O enchimento ventricular depende tanto do retorno venoso quanto da complacência desta cavidade durante a diástole. A redução da complacência ventricular, que é o que ocorre na disfunção diastólica, resulta na diminuição do volume diastólico final e aumento da pressão. Como é de se esperar, o volume sanguíneo a cada ciclo cardíaco é menor e muito embora a fração de ejeção sanguínea possa chegar a 60% do total encontrado na câmara ventricular, o débito cardíaco pode estar diminuído em relação ao coração normal. O trabalho cardíaco está diminuído (CHATTERJEE, 2012).

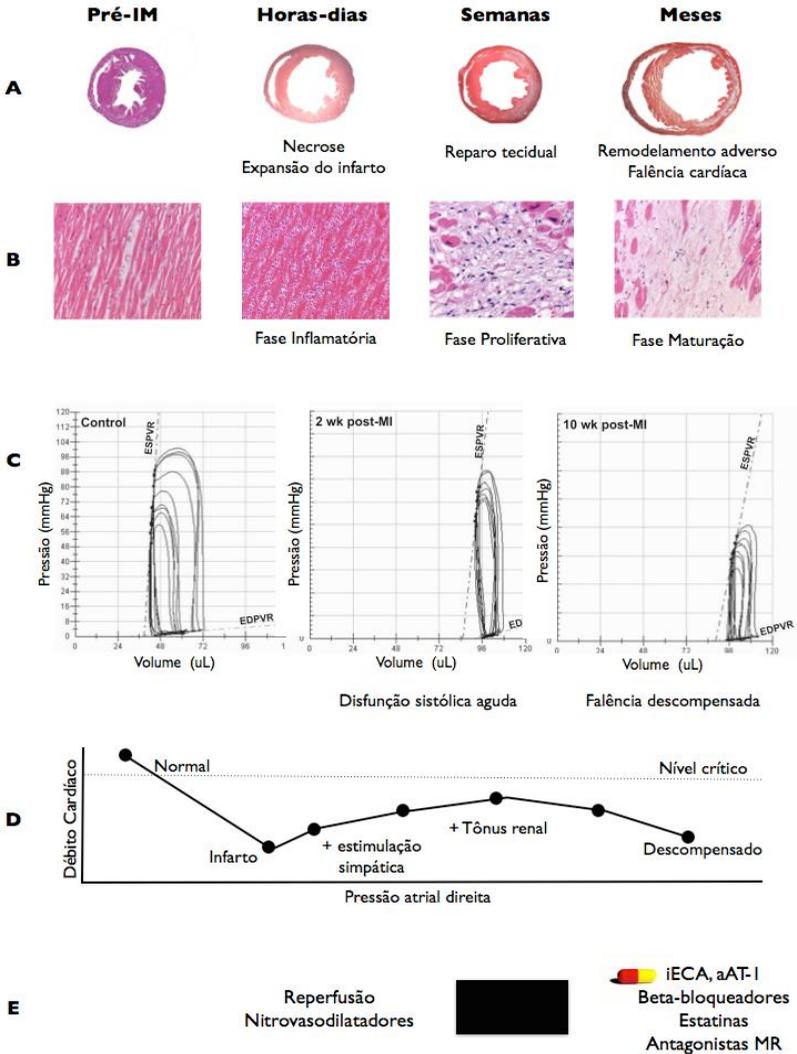
É interessante mencionar que o cateter intraventricular, além de permitir o acesso integrado à função cardíaca, no contexto da regulação neuro-humoral e endócrina, permite não só a avaliação de parâmetros cardíacos dependentes de volume, como mencionado acima sobre o mecanismo de Frank-Starling, mas também de parâmetros cardíacos que independem de volume. Neste último caso, faz-se a oclusão transitória da veia cava torácica a fim de gerar variação no retorno venoso ao coração, e assim, parâmetros como a capacidade contrátil das células cardíacas e a reserva cardíaca podem ser avaliados (Figura 3, Painel C) (Shioura *et al.*, 2007).

Quando analisada ecocardiograficamente, a falência cardíaca com disfunção sistólica é caracterizada pelo aumento do tamanho das cavidades ventriculares e diminuição da espessura de suas paredes (em alguns pacientes a espessura pode se manter inalterada). Desta forma, o estresse de parede tanto no final da sístole quanto no da diástole, apresenta-se maior. A massa ventricular apresenta-se aumentada, porém, quando se faz a relação massa/cavidade, essa relação se mantém inalterada ou até mesmo diminuída. Há alteração na forma e na geometria do coração com falência cardíaca com disfunção sistólica, apresentando aumento no eixo transversal (mais significativo) e no eixo longitudinal. A dessincronia mecânica está presente em um grande número de pacientes (KONSTAM, 2003; CHATTERJEE e KMASSIE, 2007).

Na falência cardíaca com disfunção diastólica, ecocardiograficamente é comum encontrar cavidades ventriculares com tamanho inalterado ou diminuído. A espessura das paredes e a massa ventricular apresentam-se aumentadas, assim como a relação massa/cavidade ventricular (substancialmente aumentada). O estresse de parede no final da diástole está aumentado, enquanto que no final da sístole permanece normal. No coração com disfunção diastólica não é

comum ocorrerem alterações na geometria e na forma, porém a dessincronia mecânica está presente (CHATTERJEE e KMASSIE, 2007).

Figura 3. Integração da cinética de alterações morfológicas, funcionais e neuroendócrinas decorrentes do IM, bem como a abordagem terapêutica atualmente preconizada.



Painel A: Decurso temporal das alterações na estrutura macroscópica do coração, evidenciando a progressiva substituição do tecido original (contrátil) por tecido cicatricial, que ocorre concomitante com um aumento na área da câmara em secção transversa e com o adelgaçamento das paredes ventriculares (adaptado de FRANGOGIANNIS, 2008). **Painel B:** Aspectos histológicos

(coloração H.E.) das três fases do reparo tecidual miocárdico – inflamatória, proliferativa e de maturação, que ocorrem paralelamente às alterações macroscópicas na estrutura cardíaca (adaptado de VAN DER LANN, *et al.*, 2012). **Painel C:** Cinética das principais alterações funcionais cardíacas, evidenciando o estabelecimento agudo de uma disfunção sistólica, uma fase posterior em que a função é parcialmente compensada, e, por fim, o estabelecimento de uma falência cardíaca sistólica e diastólica (adaptado de SHIOURA, *et al.*, 2007). **Painel D:** As principais compensações neuroendócrinas que participam da manutenção do débito cardíaco, demonstrando que inicialmente o tônus simpático e renal participam na melhora das funções cardíacas, mas que o aumento progressivo na pré-carga acaba por contribuir para as disfunções do coração (adaptado de GUYTON e HALL, 2011). Notar que as alterações funcionais, morfológicas e neuroendócrinas seguem um decurso temporal interdependente, *e.g.* em momentos agudos, a disfunção sistólica ocorre paralelamente ao influxo de células inflamatórias para o miocárdio, e em momentos mais crônicos, a disfunção diastólica progride à medida que o tecido cicatricial se expande. **Painel E:** Terapêutica preconizada pela Sociedade Europeia de Cardiologia (McMURRAY *et al.*, 2012) para cada uma das distintas fases da transição entre o infarto miocárdico e a falência cardíaca, tornando evidente a ausência de abordagens atuais que visem modificar a fase mais crítica para o reparo tecidual (adaptado a partir de FRACCAROLLO *et al.*, 2012).

1.3 TERAPÊUTICA UTILIZADA NO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO E NA FALÊNCIA CARDÍACA

1.3.1 Em casos de emergência

Aproximadamente 50% dos pacientes que sofrem um episódio agudo de IM apresentam alguma doença vascular associada. No entanto, no primeiro momento de intervenção médica, na grande maioria dos casos, apenas a artéria relacionada ao infarto deve ser tratada (NIELSEN *et al.*, 2011). Um dos procedimentos mais utilizados nestes casos de emergência é a reperfusão arterial, que pode ser realizada de forma mecânica, através da colocação de um cateter ou ainda, através da colocação de um *stent*, ou de forma farmacológica, por meio de um procedimento conhecido como fibrinólise. Em ambos os casos, para a realização dos procedimentos, faz-se a intervenção farmacológica com o uso de agentes antitrombóticos (*e.g.* heparina e aspirina) e nitratos orgânicos (para controle da angina e dos espasmos coronarianos) (STEG *et al.*, 2012).

É preconizado que o procedimento de reperfusão arterial deve ser realizado somente quando o início dos sintomas que caracterizam um

evento isquêmico (características clínicas como dor no peito, desconforto mandibular ou epigástrico e fadiga, além de elevação persistente do segmento ST e possibilidade de bloqueio atrioventricular) não ultrapassa 12 horas, ou ainda, quando há isquemia em curso, sem ter se iniciado o processo de necrose (NIELSEN *et al.*, 2011).

Em modelos experimentais de lesão do tipo infarto do miocárdio, é bem estabelecido que uma obstrução permanente do ramo descendente da artéria coronária promove lesões menos pronunciadas do que uma obstrução (com duração de 30-60 minutos) seguida de reperfusão. Isso acontece porque, o oxigênio, apesar de essencial para o metabolismo energético dos cardiomiócitos é uma molécula com grande potencial oxidativo. Assim, dependendo das condições redox do tecido isquêmico (que dependem do tempo de lesão transcorrido), a reperfusão pode promover resultados opostos: salvar cardiomiócitos da necrose por isquemia ou aumentar o dano oxidativo no miocárdio (DE SOUZA, 2005).

O procedimento cirúrgico com circunscrição da área infartada (*bypass* ou ponte de safena) é recomendado em casos onde a terapia de reperfusão arterial não é aconselhada, em pacientes nos quais o procedimento de reperfusão foi realizado, mas não foi efetivo ou ainda, em casos mais graves como quando há o comprometimento de múltiplos vasos sanguíneos cardíacos (STEG *et al.*, 2012).

1.3.2 Principais terapias após hospitalização

Como vimos, a doença cardíaca coronariana é uma condição crônica, de modo que os pacientes que se encontram em processo de recuperação (que dura até o final da vida) apresentam alto risco de desenvolver novos eventos isquêmicos e, não raro, morte prematura. Algumas intervenções podem auxiliar na melhora da qualidade de vida do paciente após o infarto agudo do miocárdio. No entanto, muitas dessas intervenções podem demorar alguns meses para serem implementadas, como é o caso das mudanças no hábito de vida (FOX *et al.*, 2010). Essas mudanças incluem parar de fumar, controlar a pressão arterial e o peso, alterar dieta alimentar e iniciar um programa de reabilitação física (que inclui não apenas atividade física *per se*, mas também, mudanças que visem diminuir o nível de estresse) (STEG *et al.*, 2012).

Com relação à terapia farmacológica, são utilizados desde o início agentes antitrombóticos (preferencialmente a aspirina; estes agentes são usados por tempo indeterminado) e antiplaquetários

(normalmente bloqueadores do receptor ADP – adenosina difosfato - usados por tempo limitado). Ainda, os benefícios do uso em longo prazo de beta-bloqueadores, estatinas e inibidores da via angiotensina-renina-aldosterona estão bem estabelecidos. É comum fazer-se a associação entre fármacos de diferentes classes (STEG *et al.*, 2012).

Em um primeiro momento parece contrassenso fazer uso de agentes beta-bloqueadores para o tratamento do IM e suas complicações. No entanto, essa terapia tem-se mostrado muito eficaz em alterar a progressão da doença e reduzir os índices de mortalidade (CHEN *et al.*, 2005). Isso ocorre porque, ao bloquear os receptores β -adrenérgicos, minimiza-se os efeitos citotóxicos das catecolaminas, prevenindo-se assim, a morte de um número ainda maior de cardiomiócitos no pós-IM, bem como o remodelamento cardíaco induzido pela estimulação adrenérgica excessiva. Outro fator importante é que, uma estimulação simpática excessiva diminui a eficiência cardíaca, visto que ao aumentar a força e frequência cardíaca diminui-se o tempo de relaxamento, prejudicando o enchimento ventricular e conseqüentemente, o volume sanguíneo ejetado. O uso de β -bloqueadores impede esses efeitos. Essa terapia mostrou-se mais efetiva em momentos crônicos da doença. Um fator limitante do seu uso é que esses fármacos alteram o metabolismo da glicose (NAIR *et al.*, 2012).

A redução do colesterol continua sendo um componente essencial de um programa abrangente de prevenção secundária no pós-IM. Neste sentido, seus benefícios têm sido claramente demonstrados, visto que seu uso diminui consideravelmente o número de ataques cardíacos e a mortalidade global de pacientes do sexo masculino. Há ainda evidências de diminuição da estenose coronariana (STEG *et al.*, 2012). O tratamento com estatinas (*e.g.* sinvastatina e lovastatina) deve ter início logo após o evento isquêmico, quando normalmente são prescritas altas doses do fármaco, sendo estas ajustadas a médio e longo prazo. É importante mencionar que alguns fármacos cardíacos, como é o caso dos β -bloqueadores e também, fármacos diuréticos podem influenciar adversamente os perfis lipídicos sanguíneos (NAIR *et al.*, 2012; STEG *et al.*, 2012).

É consenso que os inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) (*e.g.* Captopril) podem ser prescritos para pacientes que apresentam fração de ejeção menor do que 40% ou ainda, para pacientes que sofrem de falência cardíaca desde momentos agudos após IM. Inúmeros estudos mostram que essa terapia é segura e normalmente bem tolerada logo nas primeiras fases pós-evento isquêmico, sendo que seus benefícios podem ser observados desde a primeira semana de

tratamento. O uso de iECA está associado a uma pequena, porém significativa, redução na mortalidade (em torno de 7%). Vale ressaltar também que os iECA apresentam alguns diferenciais importantes, como: aumentam a sensibilidade à insulina (relevante no caso de pacientes diabéticos, intolerantes à glicose ou resistentes à insulina) e, principalmente, apresentam papel profilático ao prevenir a progressão da doença. Isso ocorre, pois a angiotensina II é um importante regulador do crescimento celular no músculo liso vascular e no miocárdio, e ao impedir sua formação ou ainda, minimizar seus efeitos, os iECA limitam o processo de hipertrofia vascular ou miocárdica que normalmente está presente durante a progressão da doença isquêmica (NAIR *et al.*, 2012).

Os pacientes que não toleram os iECA podem fazer uso dos bloqueadores dos receptores da angiotensina. Os trabalhos que avaliaram os fármacos desta classe (*e.g.* Losartan) como alternativas aos iECA, não mostraram nenhuma diferença entre os tratamentos, inclusive na mortalidade, que foi igual entre os grupos (STEG *et al.*, 2012).

Fármacos antagonistas da aldosterona também têm sido utilizados para o tratamento do IM e da falência cardíaca. Ainda que inicialmente não fossem considerados como tratamento de primeira escolha, um grande estudo clínico publicado no ano 2000 (ZANNAD *et al.*, 2000) revelou que os fármacos dessa classe poderiam diminuir a mortalidade após o IM em até 30% - um número bastante expressivo. Foi a partir desse estudo que os antagonistas da aldosterona ganharam importância, dando-se ênfase não apenas para o estudo acerca deles, mas principalmente, estimulando-se seu uso clínico (NAIR *et al.*, 2012).

Desde uma perspectiva cardiovascular, tem-se mostrado que o bloqueio da aldosterona previne a hipocalemia induzida pelos diuréticos, prevenindo desta forma, a ocorrência de arritmias ventriculares. Além disso, esse bloqueio diminui a produção de angiotensina II (NAIR *et al.*, 2012). É curioso notar, contudo, que esses efeitos cardiovasculares promovidos por antagonistas da aldosterona são muito menos marcantes que os efeitos de drogas como os iECA e os beta-bloqueadores, e, ainda assim, essas drogas são significativamente mais eficazes em diminuir a mortalidade pós-IM (~30% para a espironolactona contra ~7% do ramipril). Como podem ser explicados, portanto, efeitos tão expressivos desses fármacos? A resposta para essa aparente contradição reside no fato de que ao bloquear os receptores mineralocorticoides (MR), fármacos como a espironolactona interferem profundamente nos processos inflamatórios pertinentes ao reparo da lesão miocárdica. Assim, tem sido demonstrado que antagonistas MR aceleram a

resolução da inflamação pós-IM, pois favorecem que os macrófagos desenvolvam um fenótipo anti-inflamatório mais rapidamente (FRACCAROLLO, *et al.*, 2012).

Descobertas dessa natureza reforçam a importância de se buscar alternativas para modulação dos aspectos do reparo da lesão miocárdica, contemplando-se assim o coração, além dos limites da fisiologia e da farmacologia cardiovascular.

1.3.3 A lacuna terapêutica - o reparo tecidual

É indiscutível que medidas como impedir a morte de maior número de cardiomiócitos pelo processo de isquemia e modular a função cardiovascular com o intuito de restabelecer as condições hemodinâmicas que foram alteradas, são imprescindíveis no contexto de um infarto miocárdico. Desta forma, como vimos até aqui, as alternativas terapêuticas atualmente disponíveis estão voltadas para a resolução desses processos. No entanto, com o foco limitado em diminuir ou retardar a progressão da doença, uma fase fundamental do IM é negligenciada, a fase inflamatória, criando desta forma uma importante lacuna terapêutica, como pode ser visto na Figura 3, painel E (ERTL e FRANTZ, 2005; FRANGOIANNIS, 2008).

Essa lacuna terapêutica se torna muito séria quando se leva em consideração que uma vez iniciado o infarto agudo do miocárdio, a janela temporal para a recuperação da viabilidade dos cardiomiócitos é muito pequena. E ainda, quando implementada em momentos crônicos (quando a falência cardíaca já está instaurada) a terapia disponível pode fazer muito pouco ou quase nada pela recuperação do tecido miocárdico. Em contrapartida a estas duas afirmativas se sabe que a janela temporal para intervenção sobre o processo de recomposição do tecido é muito mais ampla. Corroborando com isso, trabalhos recentes têm mostrado que pode ser de grande valia terapêutica modificar a forma como ocorre o processo de cicatrização miocárdica pós-infarto, abrindo espaço para um processo reparatório menos restritivo à função cardíaca (VAN DER LAAN *et al.*, 2012; ERTL e FRANTZ, 2005; FRANGOIANNIS, 2008).

1.4 CORAÇÃO ALÉM DA CARDIOLOGIA

Não há dúvidas de que o tamanho da área infartada configura-se como um fator determinante para o desenvolvimento da falência cardíaca. Ademais, é bem sabido que outros aspectos hemodinâmicos

como uma redução na fração de ejeção maior que 45% ou reduções na pressão arterial diastólica afetam negativamente o prognóstico do pós-IM. No entanto, a despeito da importância desses índices já canônicos, hoje sabemos que o prognóstico do pós-IM não está totalmente circunscrito dentro dos limites da fisiologia cardiovascular, e que a relação entre o tamanho do infarto e a severidade da falência cardíaca não segue uma lógica tão linear. Isso se dá assim porque, além da lesão em si, outro fator fundamental é o modo como o reparo dessa lesão se estabelece, um evento de natureza inflamatória. É preciso, portanto, reconhecer que após um episódio de infarto agudo do miocárdio o coração é um órgão em franco processo de reparo tecidual, como qualquer outro tecido inflamado. Isso amplia as discussões do infarto e da falência cardíaca para além das fronteiras da cardiologia (ERTL e FRANTZ, 2005; VAN DER LAAN *et al.*, 2012).

Está amplamente demonstrado na literatura que a atividade imunológica é um fator preponderante em determinar a qualidade do reparo tecidual de lesões cutâneas e de lesões do tecido nervoso (COWIN, *et al.*, 1998; SCHWARTZ e COHEN, 2000). Assim sendo, dependendo do modo como se desenvolve a atividade imunológica em decorrência das lesões nos diversos tecidos, ela pode promover desde um reparo excessivamente fibrótico, até um reparo regenerativo. No que diz respeito aos processos de reparo tecidual decorrentes do IM, a situação não é diferente, de modo que a atividade imunológica parece ter uma participação essencial no desenvolvimento do remodelamento adverso e da falência cardíaca (STRAMER *et al.*, 2007; HOFMANN *et al.*, 2012).

Inúmeras evidências indicam que o desenvolvimento de uma reação inflamatória exagerada na fase inicial do pós-IM pode resultar no remodelamento adverso e afetar diretamente o prognóstico da doença, levando ao desenvolvimento da falência cardíaca. Estudos clínicos mostram que fazem parte dessas evidências o aumento do número de neutrófilos e monócitos no sangue dos pacientes e ainda, foi sugerido que a infiltração maciça dessas células no coração associada à degradação excessiva da matriz extracelular contribuem com a expansão do infarto e podem levar à dilatação ventricular, formação de aneurisma e até mesmo, ruptura cardíaca (HOFMANN *et al.*, 2012).

Além disso, foi demonstrado que em decorrência das lesões isquêmicas do miocárdio ocorre a liberação de proteínas citosólicas de cardiomiócitos, as quais passam a se configurar como antígenos cardíacos, induzindo uma resposta autoimune que é deletéria às funções cardíacas. Assim, observou-se que linfócitos auto-reativos podem

migrar para o miocárdio lesado e promover necrose de cardiomiócitos saudáveis, aumentando, portanto, a área de infarto (VARDA-BLOOM, *et al.*, 2000) e promovendo maior inflamação e fibrose, contribuindo com o remodelamento cardíaco adverso (LIAO e CHENG, 2006; RAMOS, *et al.*, 2012).

Com base no que foi exposto, torna-se compreensível que mesmo lesões isquêmicas inicialmente pequenas possam ter um prognóstico ruim pois, mais importante que a lesão *per se*, é o modo como o organismo reage a ela (NAHRENDORF *et al.*, 2007). Os principais fatores que influenciam o prognóstico do infarto miocárdico e da falência cardíaca, com ênfase nos eventos imune-inflamatórios encontram-se apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Fatores que afetam negativamente o prognóstico após o IM.

<p style="text-align: center;">Canônicos</p> <ul style="list-style-type: none">- Diabetes- Fração de ejeção < 45%- Dimensão da lesão- Edema pulmonar- Fibrilação atrial <p style="text-align: center;">Imune-inflamatórios</p> <ul style="list-style-type: none">- Monocitose ou monocitopenia- Tratamento com corticoides- Anticorpos anti-troponina- Linfócitos T autorreativos- Esplenectomia (experimental)
--

Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma vez reconhecendo-se que a atividade inflamatória define a qualidade do reparo tecidual, bem como a progressão do IM, torna-se evidente a necessidade de novas abordagens terapêuticas que visem modificar esses processos de reparo. Inclusive, cabe mencionar nesse momento que recentes trabalhos têm mostrado que as abordagens terapêuticas convencionais (cujo racional terapêutico foi desenhado para resgatar aspectos hemodinâmicos) devem seu sucesso clínico ao fato de também modularem fenômenos relacionados com o reparo tecidual – não são somente fármacos cardiovasculares (ERTL e FRANTZ, 2005, FRACCAROLLO *et al.*, 2012).

Além dos fármacos antagonistas da aldosterona, já mencionados anteriormente, dados experimentais e clínicos mostram que os fármacos iECA, β -bloqueadores e estatinas interferem positivamente no processo de reparo tecidual pós-IM. Esses fármacos atuam diminuindo a expressão de determinadas citocinas, reduzindo o infiltrado leucocitário e ainda, reduzindo a deposição de colágeno, contribuindo desta forma, com um bom prognóstico (ERTL e FRANTZ, 2005).

1.5 DA BANCADA AO LEITO - NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS VOLTADAS PARA O REPARO DA LESÃO MIOCÁRDICA ISQUÊMICA

A principal abordagem terapêutica que vem sendo desenvolvida para melhorar o reparo cardíaco pós-IM é a administração de células pluripotentes que, em tese, seriam capazes de se diferenciar em novos cardiomiócitos. Porém, a despeito desse promissor racional terapêutico, ressalta-se que diversos estudos têm demonstrado que os possíveis efeitos benéficos da terapia celular parecem depender mais de uma modulação do microambiente inflamatório no local das lesões do que de sua transformação direta em novas células contráteis (MURRY *et al.*, 2004).

Outra possibilidade de se intervir terapêuticamente no reparo tecidual cardíaco é através da modulação da resposta inflamatória pós-IM. Assim, diversos autores têm se proposto a desenvolver terapias anti-citocinas (ou anti-quimiocinas) que modulem a sinalização de eventos inflamatórios específicos. Cabe ressaltar, no entanto, que a modulação terapêutica das citocinas torna-se muito difícil uma vez que a grande maioria delas apresenta papel dual, dependendo do momento e do nível de sua expressão (FRANTZ, *et al.*, 2009). Um exemplo disso é que a administração de citocinas inflamatórias como a interleucina-1 β em momentos agudos do pós-IM é capaz de diminuir o dano cardíaco (BROWN *et al.*, 1992). No entanto, a ativação desta mesma citocina em momentos tardios se mostrou deletéria, aumentando a área de infarto e a dilatação ventricular (MERKLE *et al.*, 2007).

De maneira similar, o fator de necrose tumoral (TNF) também parece apresentar efeitos duais no contexto do pós-IM. Por um lado, observou-se que esta citocina é capaz de mimetizar vários dos sintomas da falência cardíaca, de modo que camundongos que expressam quantidades supra-fisiológicas desta citocina desenvolvem falência cardíaca. Por outro lado, camundongos com deleção gênica para receptores de TNF apresentam significativo aumento no tamanho da

área infartada após obstrução das artérias coronarianas (BRYANT *et al.*, 1998). Considerando-se essa dualidade no papel de diversas citocinas no reparo tecidual, é provável que esse tipo de abordagem terapêutica seja simplista demais para avançar a ponto de permear novas práticas clínicas. Assim alguns autores têm buscado outros caminhos para modificar a atividade imuno-inflamatória após o IM.

Além de abordagens que visam modificar aspectos humorais da resposta inflamatória, outra possibilidade aventada é a modulação do fenótipo dos leucócitos envolvidos nessa resposta. Ao remover as células apoptóticas do tecido lesionado, os macrófagos mudam seu fenótipo celular, de modo a antecipar a resolução do processo inflamatório (RAMOS *et al.*, 2007; BET, 2008). Assim, eles deixam de promover inflamação e degradação do tecido e passam a ativar mecanismos de reconstrução tecidual (*e.g.* deixam de expressar metaloproteinases e passam a sintetizar matriz extracelular). O principal mecanismo através do qual os macrófagos são capazes de reconhecer as células apoptóticas é através da interação com a fosfatidilserina exposta na membrana de células que iniciam o processo de apoptose. Com base nessas informações, Harel-Adar e colaboradores (2011) observaram que a administração de lipossomas contendo fosfatidilserina foi capaz de promover alguns benefícios como angiogênese e prevenção/retardamento do remodelamento cardíaco adverso. Inclusive já foram realizados testes clínicos em humanos onde se testou a administração de leucócitos autólogos apoptóticos (teste ACCLAIM) no qual se encontrou benefícios em pacientes cuja falência cardíaca não havia sido deflagrada por IM (TORRE-AMIONE *et al.*, 2008).

Por fim, considerando-se que diversos estudos demonstraram que após o infarto miocárdico pode haver o desenvolvimento de uma resposta autoimune contra proteínas cardíacas (MAISEL *et al.*, 1998) uma nova e promissora abordagem terapêutica pode se dar através da indução de tolerância imunológica a esses componentes (RAMOS *et al.*, 2012).

1.5.1 Tolerância imunológica

A tolerância imunológica que se estabelece aos antígenos inicialmente contatados pela mucosa oral, também chamada “tolerância oral”, foi observada desde muito cedo na história da imunologia (BESREDKA 1909; WELLS 1911) no entanto, só despertou o interesse dos imunologistas a partir dos anos 1970. Atualmente, podem ser encontrados na literatura centenas de trabalhos acerca deste tema. A

tolerância imunológica foi classicamente definida como uma supressão específica da resposta imune celular e/ou humoral a antígenos inicialmente contactados pela mucosa oral ou nasal (revisado por FARIA *et al.*, 1998, FARIA e WEINER, 2005; REIS e MUCIDA, 2012; PABST e MOWAT, 2012). Virtualmente, qualquer manifestação imune-específica pode ser suprimida através de diferentes regimes de administração de antígenos orais. O leque vai desde respostas avaliadas *in vivo*, como hipersensibilidade do tipo tardia, formação de imunoglobulinas, até parâmetros aferidos *ex vivo*, como a proliferação de linfócitos e secreção de citocinas (FARIA e WEINER, 2005).

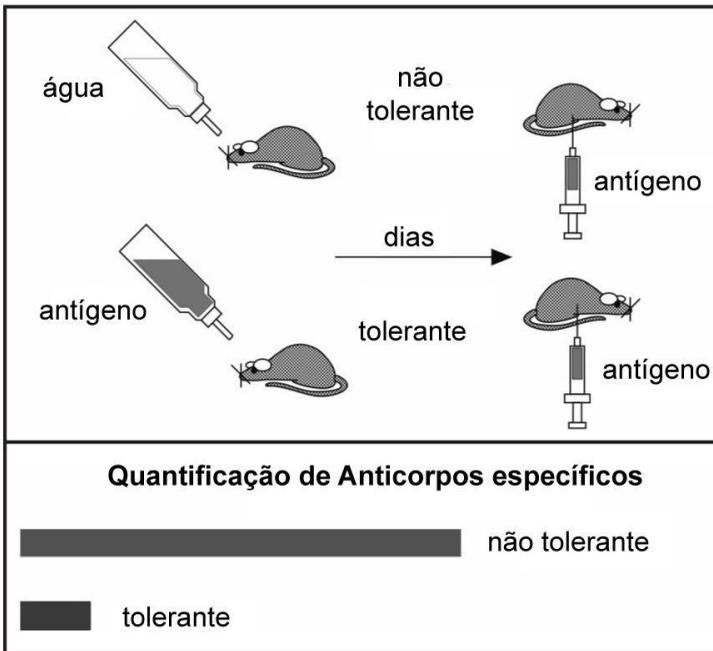
De maneira simplificada, o fenômeno conhecido como tolerância oral pode ser mencionado da seguinte maneira: se um animal ingeriu ou recebeu por uma sonda gástrica (gavagem) um antígeno com o qual não teve contato antes, ele responderá com menor intensidade à imunização (subcutânea, intraperitoneal, etc.) subsequente com o mesmo antígeno (em adjuvantes), quando comparado a um animal-controle que não ingeriu o antígeno (VAZ *et al.*, 1977; VERDOLIN *et al.*, 2001; RAMOS *et al.*, 2009). Uma representação ilustrativa acerca desse fenômeno encontra-se ilustrada na Figura 4.

A tolerância oral não está completamente esclarecida do ponto de vista do seu mecanismo, no entanto alguns mecanismos celulares e moleculares já foram propostos para explicar como os materiais cujo contato foi feito pela rota oral são incorporados ao sistema imunológico sem deflagrar respostas progressivas. Alguns autores têm proposto como mecanismo a deleção de células T específicas para o antígeno tolerado, indução de anergia, ou ainda supressão por células T regulatórias. Sabe-se, por exemplo, que o fator transformador de crescimento beta (TGF- β) tem sido apontado como molécula central nesse fenômeno que é dependente do particular contexto dos órgãos linfóides associados à mucosa (MOWAT, 2003). No entanto, essa é ainda uma área pouco estudada na imunologia, devido ao fato de ter sido historicamente pouco explorada. Dependendo da dose do antígeno administrada, da linhagem de animal estudado, ou do modelo experimental abordado, as particularidades moleculares variam enormemente (FARIA e WEINER, 2005).

É importante mencionar que a tolerância oral não se trata de uma mera omissão ou ausência de resposta do organismo. Já foi demonstrado que a tolerância oral é um fenômeno que envolve plena ativação linfocitária (CASTRO-JUNIOR *et al.*, 2012) e que demanda a presença de um sistema imunológico totalmente desenvolvido, não podendo ser induzida em animais neonatos ou senis (FARIA *et al.*, 1998). Além

disso, a tolerância oral pode ser transferida de um animal tolerante para um animal *naive* através da adoção de células esplênicas, ou mesmo do soro (CUNHA *et al.*, 2008). Por um lado, o grupo de Weiner têm sugerido que os linfócitos T-CD4+ ativados no contexto intestinal se desenvolvem como um grupo discreto de células que secretam citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e/ou TGFbeta (FARIA e WEINER, 2005).

Figura 4. A "tolerância oral".



Animais que ingeriram uma dada proteína podem desenvolver refratariedade à formação de anticorpos, se subsequentemente forem imunizados com a mesma proteína por via parenteral (por ex., intraperitoneal com adjuvantes). Extraído de VAZ E FARIA, 1993.

Não sendo uma simples negação protelada, como entender então a tolerância oral? Dados de Verdolin e colaboradores (2001) sugerem que esse fenômeno pode ser descrito nos termos de estabilização da atividade imunológica. Dependendo da dose administrada oralmente, a supressão da resposta a exposição parenteral do antígeno é reduzida a diferentes patamares. Eventualmente as respostas são completamente abolidas, mas eventualmente são quase mantidas inalterada, caso a dose

de antígeno ingerida seja suficientemente baixa. Acontece, porém, que quando animais tornados “parcialmente tolerantes” são novamente expostos a subsequentes desafios com o antígeno (*boost*), não se observa um aumento progressivo da resposta, como aconteceria no caso da imunização. Dito de outra maneira, animais tolerantes não apresentam aquilo que se chama “memória” imunológica. Assim, a principal diferença entre tolerância e imunidade não seria ausência ou presença de resposta, mas a estabilização de um patamar de atividade (VERDOLIN *et al.*, 2001). Nelson Vaz tem feito um grande esforço para chamar atenção que a principal diferença entre tolerância e imunização é a conservação de um modo de operar estável, que não reage progressivamente a cada novo encontro (*e.g.* VAZ *et al.*, 2006).

Castro-Junior e colaboradores (2012) realizaram um recente estudo comparando o perfil cinético de ativação celular entre animais tolerantes e imunizados e chegaram a uma interessante conclusão: a principal diferença mecanística entre estes grupos está na cinética e não simplesmente no perfil de ativação celular. Animais tolerantes também apresentam uma resposta inflamatória inicial, porém transiente, já que prontamente mobilizam células secretoras de IL-10 e TGFbeta. Animais imunizados também resolvem a resposta imune através da produção das mesmas citocinas, porém o fazem tardiamente.

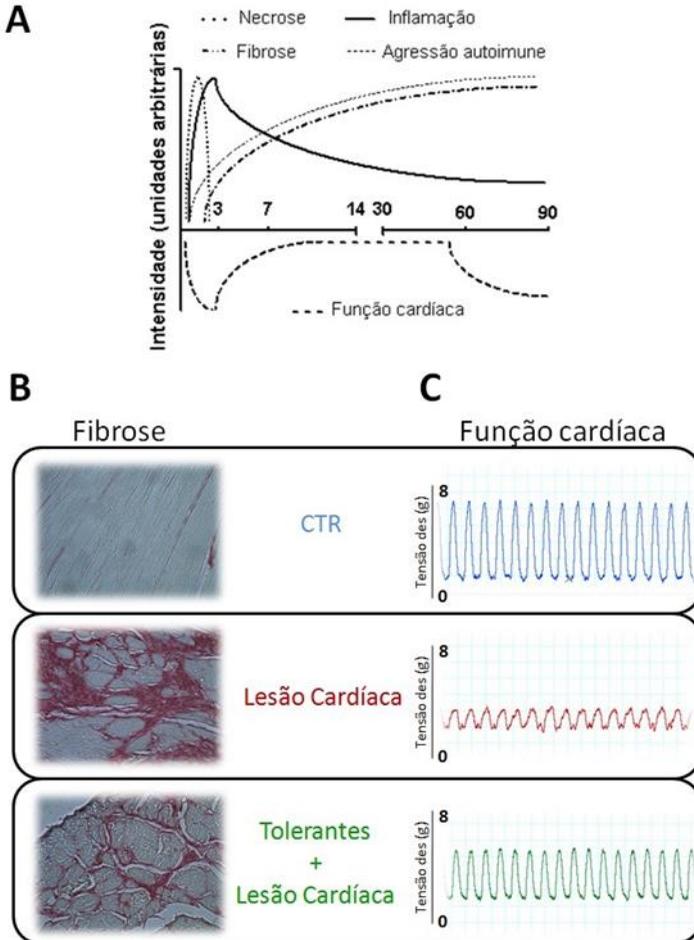
A tolerância oral ou nasal se mostrou como uma alternativa eficaz no tratamento experimental de diversas doenças auto-imunes (*e.g.* encefalite, uveíte, tireoidite, artrite, diabetes) e não auto-imunes (*e.g.* asma, aterosclerose, alergias, colite, derrame, modelos da doença de Alzheimer) (FARIA e WEINER, 2005), assim como durante o reparo de lesões cutâneas (COSTA *et al.*, 2011).

Por fim, levando em conta o fato de que contatos antigênicos iniciados no contexto da mucosa intestinal direcionam a atividade imunológica para um perfil tolerogênico, em trabalhos prévios realizados em nosso laboratório foi desenvolvido um protocolo de tratamento oral com um extrato cardíaco realizado previamente à indução das lesões miocárdicas. Este protocolo mostrou-se eficaz em promover tolerância imunológica aos componentes cardíacos, e isto se correlacionou com uma menor inflamação e fibrose pós-infarto. Sobretudo, o desenvolvimento de tolerância imunológica aos componentes cardíacos foi capaz de prevenir a disfunção cardíaca pós-infarto (RAMOS *et al.*, 2012). Uma representação esquemática dos principais achados de nosso grupo encontra-se resumida na Figura 5.

Cabe mencionar que, ainda que esses achados apontem para uma interessante e promissora possibilidade terapêutica, eles são bastante

incipientes, e que essa abordagem precisa ser explorada com maior profundidade. Nesse contexto é que se insere a proposta deste trabalho.

Figura 5. A relação entre atividade imunológica e o reparo tecidual cardíaco pós-lesão isquêmica.



(A) Perfil temporal das alterações pós-lesão, indicando a necrose (inferida a partir da quantificação da atividade plasmática das enzimas lactato desidrogenase e creatina quinase), inflamação e fibrose (mensuradas histologicamente), bem como da função cardíaca (avaliada através da preparação de Langendorff). Importante perceber que o desenvolvimento de uma autorreatividade imunológica se desenvolve com um perfil temporal semelhante ao da deposição de colágeno no miocárdio. Nesse contexto,

encontramos previamente que animais tornados tolerantes aos antígenos cardíacos seguem um reparo tecidual menos fibrótico (analisado em cortes de coração corados com picosirius em B) e com menor prejuízo motor (C).
FONTE: RAMOS, 2011.

1.6 PROPOSTA DE TRABALHO

Com base no que foi exposto, acreditamos que se faz necessário dar continuidade ao trabalho iniciado anteriormente por nosso grupo, com enfoque principal nas consequências funcionais cardíacas da tolerância imunológica aos componentes do coração expostos no contexto da lesão miocárdica. E ainda, estudar em maiores detalhes como esse protocolo modifica o processo inflamatório e, conseqüentemente, o reparo do miocárdio lesionado.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Nossos objetivos no presente trabalho são: (1) esclarecer em maior detalhe como a tolerância imunológica à antígenos cardíacos influencia a funcionalidade do miocárdio lesionado; e (2) investigar como este tratamento é capaz de modular o reparo tecidual cardíaco ao interferir na cinética e no fenótipo do infiltrado leucocitário.

2.2 ESPECIFICOS

Ao focar nossas atenções sobre as interfaces entre a fisiologia cardíaca e a atividade imunológica que surge após o infarto miocárdico, nossos objetivos no presente trabalho incluem:

1. Estudar em maiores detalhes como a ingestão de proteínas cardíacas anteriormente a indução da lesão miocárdica é capaz de promover tolerância imunológica aos componentes do coração;
2. Observar o desempenho cardíaco após a indução de lesão miocárdica do tipo infarto e ainda, a influência do protocolo de tolerância imunológica sobre a atividade cardíaca, através da realização de medidas hemodinâmicas feitas por meio da utilização de um catéter específico que fornecerá informações sobre pressão e volume intraventricular cardíaco e suas derivadas a cada ciclo cardíaco;
3. Avaliar de forma cinética o perfil do infiltrado inflamatório no miocárdio lesionado através de abordagem imunohistoquímica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para a realização deste trabalho, foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* com aproximadamente 90 dias de idade, pesando entre 300 e 350 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h) controladas automaticamente. Água e ração foram fornecidos à vontade. Todos os protocolos realizados foram previamente avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) sob o número de Protocolo PP00469 e estão de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a utilização de Animais para fins científicos e didáticos-DBCA, 2013; CONCEA).

3.2 MODELO EXPERIMENTAL

Lesões miocárdicas foram induzidas nos animais mediante a administração subcutânea de isoproterenol-DL-sulfato (150 mg/Kg) por dois dias consecutivos, de acordo com o modelo previamente estabelecido por Rona *et al.*, (1959) e já bem documentado na literatura (PARISSIS *et al.*, 2002; DOBACZEWSKI *et al.*, 2010; MATZINGER e KAMALA, 2011). Esse protocolo promove uma lesão miocárdica isquêmica com características semelhantes ao infarto do miocárdio (RONA *et al.*, 1959), causando a morte de 10-20% dos animais logo após a primeira injeção de isoproterenol.

Aspectos morfológicos foram avaliados 1, 3 e 7 dias após a segunda administração de isoproterenol, enquanto que os aspectos funcionais cardíacos foram avaliados 3 e 15 dias após.

3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

O presente estudo contou com três grupos experimentais: um composto de animais sem qualquer manipulação (*naïve* ou controle; CTR); um grupo de animais submetidos à lesão cardíaca induzida por isoproterenol (ISO); e um grupo de animais submetidos ao protocolo de tolerância oral a antígenos cardíacos sete dias antes da indução da lesão

cardíaca (TOL + ISO). Observações preliminares mostraram que o tratamento oral com antígenos cardíacos não promoveu nenhuma alteração nos parâmetros avaliados em ratos *naïve* e, portanto, por questões de bem-estar animal e economia, este grupo não foi avaliado rotineiramente.

3.3.1 Preparo de extrato cardíaco

Corações de animais normais foram coletados, ambos ventrículos esquerdo e direito foram separados e picados em solução de Hanks resfriada a 4°C, e depois homogeneizados mecanicamente, conforme previamente descrito na literatura (TOOD *et al.*, 1983). Em seguida, esta solução foi congelada e descongelada por três vezes em nitrogênio líquido, e depois centrifugada a 1000 x g por 15 minutos, conforme padronizado por Ramos (2011). A concentração de proteínas solúveis presentes no sobrenadante deste extrato cardíaco foi quantificada através da técnica de Bradford e ajustada para ser administrada conforme o interesse.

3.3.2 Protocolo de tolerância oral

Com o intuito de se reforçar a tolerância natural aos componentes cardíacos por meio do processo de tolerância oral, os animais receberam três administrações orais (gavagem), em dias consecutivos, da solução de extrato cardíaco contendo 20 mg de proteínas totais (em um volume de 250 µl de PBS), 7 dias antes da indução da lesão cardíaca com isoproterenol (grupo TOL+ISO). A escolha deste protocolo de tolerância oral foi baseada em nossa experiência prévia acerca do tema e em outros trabalhos da literatura (DOBACZEWSKI *et al.*, 2010; PORTER e TURNER, 2009). A escolha da dose de proteínas cardíacas totais foi baseada em trabalhos prévios que promoviam tolerância oral à ovalbumina (CARVALHO *et al.*, 1994; 1996; 1997; VERDOLIN *et al.*, 2001; RAMOS *et al.*, 2009).

3.4 PARÂMETROS AVALIADOS

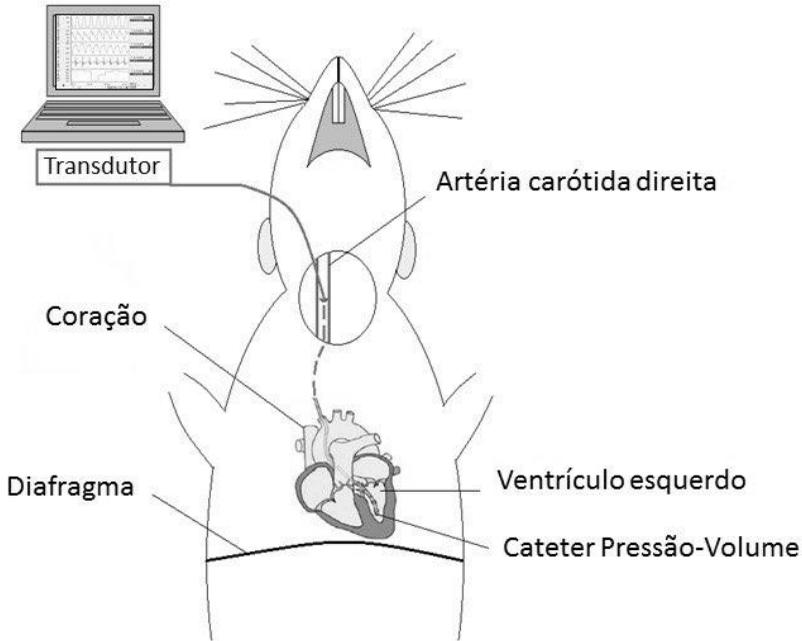
3.4.1 Parâmetros funcionais cardíacos

3.4.1.1 Análise *in vivo* da função cardíaca por meio da avaliação das relações de pressão e volume intraventricular a cada ciclo cardíaco

Três e quinze dias após a indução da lesão cardíaca do tipo infarto (segunda dose de isoproterenol), os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina e xilazina (100/20 mg/Kg; i.m.) e posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa aquecida à 37°C. Após a confirmação da ausência de resposta à estímulos externos de pinçamento dos membros pélvicos e da cauda, realizou-se punção da veia caudal lateral para a inserção de um catéter intravascular (24G) para a administração de heparina (10 UI), com o intuito de se prevenir a formação de coágulos durante todo o procedimento (cateterismo). Em seguida, o anestésico local lidocaína (2%, sem vasoconstritor) foi administrado na pele e tecido celular subcutâneo da região ventral do pescoço (volume final de 100 µL para cada sítio de administração) para posterior incisão e divulsão dos tecidos e localização da veia jugular esquerda (para administração de dobutamina) e localização/isolamento da artéria carótida direita (para inserção do cateter intraventricular).

Um cateter específico (modelo SPR-901, Millar Instruments, Houston, TX, EUA), composto por quatro eletrodos de condutância e um micromanômetro acoplado a um sistema de aquisição de dados e polígrafo (MPVS-Ultra Single Segment Pressure-Volume Unit[®]; Millar Instruments, Houston, TX, EUA; e PowerLab 4/30[®] e LabChart[®] Pro v. 7.3.3, ambos da AD Instruments, Castle Hill, Austrália), foi introduzido retrogradamente no ventrículo esquerdo através da artéria carótida direita e permitiu o registro de curvas de relação pressão-volume em tempo real, as quais puderam revelar importantes alterações na funcionalidade e capacidade de adequação do coração frente a diferentes estímulos (Figura 6). A confirmação acerca do correto posicionamento do cateter no interior da câmara ventricular foi realizada mediante a observação das curvas ventriculares características de pressão e volume (Figura 7). Após, seguiu-se um período de estabilização de 20 minutos, necessários para o restabelecimento das funções cardíacas.

Figura 6. Esquema representativo do procedimento de cateterismo do ventrículo esquerdo a partir da artéria carótida direita por meio do cateter de pressão-volume (SPR-901, Millar Instruments Inc., Houston, TX, EUA).



Fontes: GONÇALVES, 2014; PACHER *et al.*, 2008.

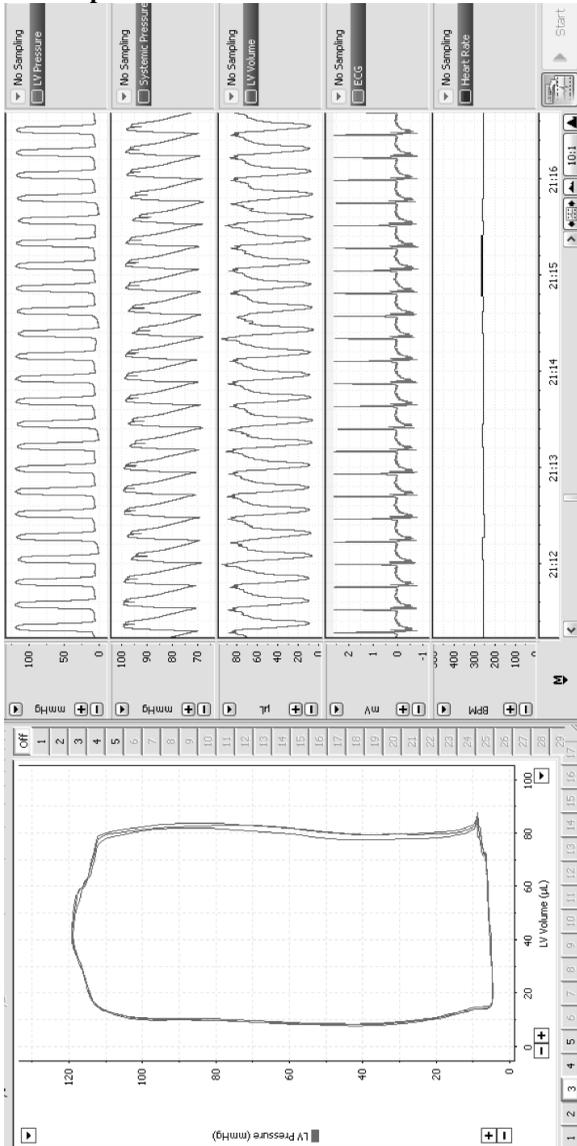
Valores basais da pressão ventricular esquerda (mmHg) e volume ventricular esquerdo (microlitros, μL) a cada ciclo cardíaco, assim como pressão arterial sistêmica (mmHg) e frequência cardíaca (FC) foram medidos imediatamente após o período de estabilização, durante 5 minutos. Em seguida, com a finalidade de se avaliar a reserva cardíaca dos animais, doses crescentes (3, 10, 30 nmol/Kg) de dobutamina (agonista beta-adrenérgico) foram injetadas na veia jugular. As alterações hemodinâmicas provocadas por cada uma das doses testadas foram registradas até o término (aproximadamente 5 minutos), e só então a próxima dose foi administrada. Todas as medidas adquiridas após a estimulação com dobutamina foram obtidas durante o pico máximo da resposta gerada pela mesma (em um intervalo de 5 segundos). Ao final do experimento, após a completa normalização dos parâmetros hemodinâmicos, com o intuito de se determinar o valor de condutância paralela, a qual representa a condutividade elétrica não desejada da parede muscular do ventrículo esquerdo e tecidos circunvizinhos, foram

administrados 30 μ L de salina hipertônica (30%) através da veia jugular esquerda.

Por meio dos valores de pressão e volume ventricular obtidos, foi possível realizar medidas indiretas de pressão sistólica final (PSF), pressão diastólica final (PDF), volume sistólico final (VSF), volume diastólico final (VDF), volume de ejeção (VE), elastância arterial (E_a); e índices sistólicos como fração de ejeção (FE), trabalho cardíaco (TC), pico de pressão intraventricular positiva desenvolvida ao longo do tempo (dP/dt_{max}); e índices diastólicos como a constante de tempo do relaxamento isovolumétrico (Tau , calculado por meio do método de Glantz) e o pico de pressão intraventricular negativa desenvolvida ao longo do tempo (dP/dt_{min}). Todas essas derivadas foram calculadas *offline*, durante um intervalo de 5 segundos antes da injeção de dobutamina (valores basais) ou no pico do efeito gerado por esta droga.

Por fim, o volume e a pressão foram calibrados pelos métodos da cubeta (através de áreas e volumes conhecidos) e pela interface do sistema (MPVS-Ultra[®], v.2.0; Millar Instruments, Houston, TX, EUA, respectivamente), de acordo com as instruções do fabricante.

Figura 7. Registro típico das medidas de pressão e volume intraventricular cardíaco obtidos a partir de um animal naïve.

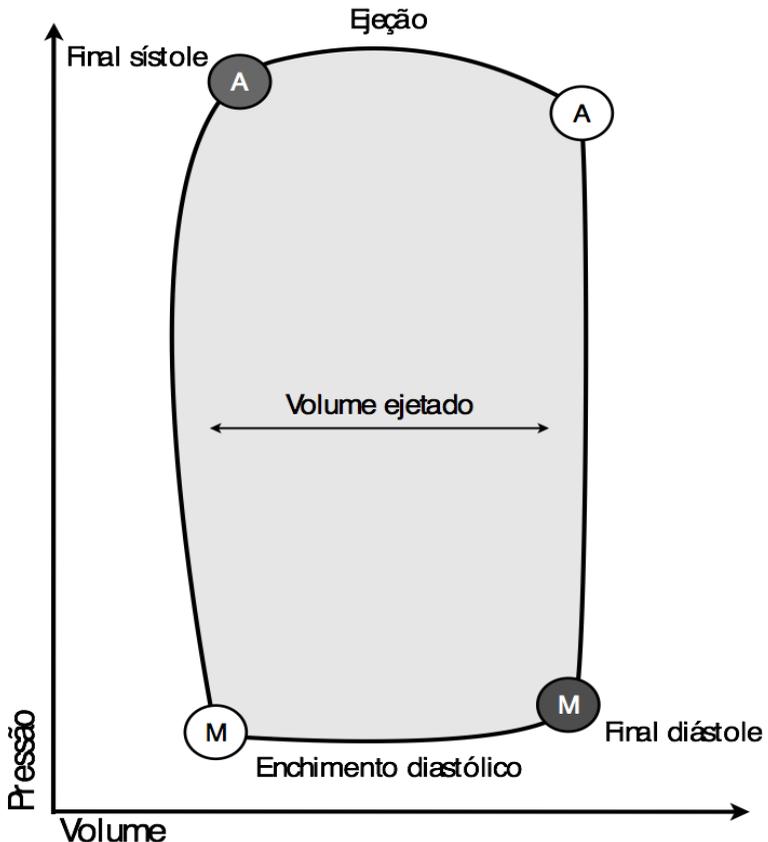


Ao lado esquerdo encontra-se uma curva de pressão (mmHg) x volume intraventricular (µL) cardíaco. Ao lado direito encontram-se respectivamente as médias de pressão ventricular esquerda (mmHg); pressão sistêmica (mmHg,

medida na aorta); volume ventricular esquerdo (μL); eletrocardiograma, e frequência cardíaca (bpm). Fonte: Elaborado pelo autor.

Com o intuito de se facilitar o entendimento destes dados, apresentamos na Figura 8 uma breve descrição sobre as principais medidas hemodinâmicas realizadas neste trabalho.

Figura 8. Curva representativa de relação pressão-volume durante o ciclo cardíaco.



Os símbolos “M” e “A” abertos indicam o momento de abertura das valvas mitral e aórtica, respectivamente, ao passo que os símbolos fechados indicam o fechamento das mesmas. O fechamento da valva mitral marca o fim da diástole, enquanto que o fechamento da valva aórtica marca o fim da sístole. As principais medidas de pressão e volume são realizadas ao final da sístole e da

diástole (VSF, VDF, PSF, PDF). A diferença de volume entre o final da sístole e da diástole indica o volume ejetado a cada ciclo cardíaco, e a normalização do volume ejetado pelo tempo ($\mu\text{L/s}$) indica o débito cardíaco. A diferença entre as pressões máxima (final da sístole) e mínima (final da diástole) é denominada pressão desenvolvida. As derivadas temporais do desenvolvimento da pressão dPdT (mmHg/s) indicam as velocidades de contração (derivada positiva) e relaxamento (derivada negativa). A área circunscrita dentro da curva de pressão-volume é considerada uma medida direta do trabalho cardíaco.

3.4.2 Parâmetros imunológicos

3.4.2.1 Obtenção do material biológico para a técnica de imunohistoquímica

Para se estudar o processo inflamatório desencadeado pela lesão miocárdica, utilizou-se tecido cardíaco dos animais infartados 1, 3 e 7 dias após a segunda administração de isoproterenol. Anteriormente à coleta de material realizada 3 dias após a indução da lesão isquêmica, fez-se a obtenção dos dados funcionais cardíacos.

Os animais foram sacrificados com uma solução contendo altas doses dos anestésicos quetamina e xilazina, administrada por via intravenosa. Imediatamente após, os corações foram retirados, pesados e fixados em formalina 4% durante 24 horas. Posteriormente, foram realizadas secções coronais do miocárdio ($5\ \mu\text{m}$ de espessura), e processamento histológico rotineiro padrão, conforme previamente descrito (RAMOS, 2011; BICCA, 2012).

3.4.2.2 Técnica de imunohistoquímica

Os cortes histológicos foram desparafinados por imersões consecutivas em xilol e reidratados por passagens sucessivas em etanol em concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90%, 80%, 70%, e enfim, água). O bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com o objetivo de se eliminar reações inespecíficas falso-positivas. Para tanto, as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 1,5% e metanol absoluto (v/v) por 20 minutos e em ambiente escuro, com posterior lavagem em água destilada. Em seguida, as lâminas foram submetidas ao tratamento para a reativação antigênica, visando recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em paraformaldeído e parafina. Desta maneira, foi preparada uma solução composta por ácido cítrico (0,1 M) e citrato de

sódio (0,1 M; pH 6,0). As lâminas foram imersas nesta solução de reativação antigênica e mantidas em banho-maria ajustado para 95-98°C, durante 45 minutos. Logo após, ainda como parte do processo de reativação antigênica, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 minutos à temperatura ambiente e lavadas com água destilada. Após a lavagem as lâminas foram submersas em PBS.

A imunodeteção foi realizada com os seguintes anticorpos contra as proteínas de interesse: IL-10 (anticorpo policlonal produzido em coelho, Abcam 9969), NOS-2 (anticorpo policlonal produzido em coelho, Abcam 15323), fosfo-NF-kB-P65 (Ser 536) (anticorpo monoclonal produzido em coelho, Cell Signal 3033), e arginase-1 (anticorpo policlonal produzido em cabra, Abcam 118884). A solução contendo os anticorpos previamente diluídos foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 2-8°C, durante 12 a 16 horas. A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS à temperatura ambiente. Após a lavagem, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário biotilado apropriado, em câmara úmida, durante 50 minutos, à temperatura ambiente. Após lavagem do anticorpo secundário não ligado, as lâminas foram incubadas com estreptavidina ligada à peroxidase por um período de 40 minutos (em câmara úmida à temperatura ambiente). Por fim, após lavagem da estreptavidina não ligada, a reação da peroxidase foi detectada com o uso de solução cromógena contendo 3,3'-diaminobenzidina (3,3',4,4'-tetra-amino-bifenil-tetra-hidrocloro) e peróxido de hidrogênio. Os núcleos foram contra-corados em solução de hematoxilina de Harris e lavados com água amoniacal. Por fim, as lâminas foram desidratadas através da passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70%, 80%, 90% e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em meio permanente (Entellan; Merck, São Paulo, SP, Brasil). Para cada reação foi utilizado um controle negativo que consistiu na remoção do anticorpo primário da reação.

Cinco imagens por corte de tecido foram capturadas e digitalizadas por uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico, adquiridas com ampliação de 200 vezes. A quantificação relativa da imunomarcagem foi obtida através da análise de densitometria (densidade óptica) automática, utilizando-se o programa de imagens NIH ImageJ (NIH; Bethesda, MD, EUA), através do qual fez-se a quantificação de células positivas em relação a área total (%), contagem total de núcleos (hematoxilina) e a contagem de células positivas (peroxidase).

3.5 COMPOSTOS E REAGENTES

Solução e sais: salina tamponada com fosfato (PBS, composição em mM: 137 de NaCl; 2,7 de KCl; 1,5 de KH_2PO_4 , e 8,1 de NaHPO_4 ; pH 7,4).

Compostos anestésicos e/ou sedativos e para analgesia: cloridrato de xilazina 2% (Anasedan[®]), e cloridrato de cetamina 10% (Dopalen[®]), (ambos Sespo Indústria e Comercio Ltda; Paulínia, SP, Brasil); cloridrato de lidocaína (2%, sem vasoconstritor) (Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil).

Outros compostos: heparina sódica 5000 UI/ml (Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil); dobutamina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA).

Anticorpos e reagentes para imunohistoquímica: IL-10 (ab9969), NOS-2 (ab15323), e arginase-1 (ab118884), (todos obtidos da Abcam, Cambridge, MA, USA); fosfo-NF-kB-P65 (Ser 536) (3033) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); entellan e ácido cítrico, (obtidos da Merck, São Paulo, SP, Brasil); isopropanol, etanol, metanol, acetona, xilol, paraformaldeído e citrato de sódio (todos, Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil); hematoxilina de Harris (Newprov, Pinhais, PR, Brasil); peróxido de hidrogênio (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), de um número (n) de animais que variou entre 6 - 8 por grupo (hemodinâmica) ou 3-5 por grupo (histologia). Após verificar a normalidade, os resultados de interesse foram submetidos à análise de variância (ANOVA) (uma ou duas vias), sendo que, quando a ANOVA revelou uma interação significativa entre as variáveis, o teste *post-hoc* de Tukey com medidas repetidas foi utilizado. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando $P < 0,05$ (indicado por * ou #). A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism[®] (San Diego, CA, USA).

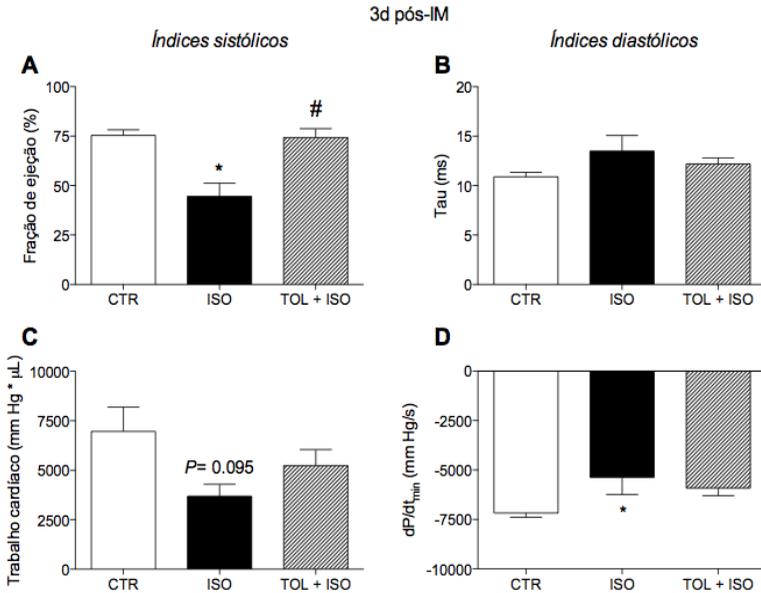
4 RESULTADOS

4.1 PARÂMETROS FUNCIONAIS CARDÍACOS

Os valores basais dos parâmetros hemodinâmicos avaliados são apresentados na Tabela I, sendo que uma compilação dos resultados mais importantes é apresentada como gráficos de barras nas Figuras 9 e 11. Conforme sugerido por Pacher e colaboradores (2008), os parâmetros fração de ejeção e trabalho cardíaco foram considerados como principais índices sistólicos, enquanto que a constante de tempo do relaxamento isovolumétrico (*Tau*) e o pico de pressão intraventricular negativa desenvolvida ao longo do tempo (dP/dt_{\min}), foram considerados como os mais representativos parâmetros da função diastólica.

A administração de isoproterenol (150 mg/Kg) provocou, de forma aguda, severa disfunção sistólica e diastólica cardíaca. Assim sendo, 3 dias após a segunda injeção de isoproterenol observou-se significativa redução na fração de ejeção (CTRL: 73,4% \pm 2,8; ISO: 44,6% \pm 6,3; $P < 0,05$ entre CTRL e grupo ISO) e dP/dt_{\min} (CTRL: -7174 mmHg/s \pm 216; ISO: -5367 mmHg/s \pm 870; TOL+ISO: -5915 \pm 317; $P < 0,05$ entre CTRL e grupo ISO) (Figura 9A, D). Os parâmetros, trabalho cardíaco (Figura 9C) e *Tau* (Figura 9B) apresentaram resultados similares, porém, não apresentaram significância estatística. Adicionalmente, observou-se que a redução na fração de ejeção ocorreu em paralelo com o aumento no volume sistólico final (VSF) (Tabela I), confirmando o dano sistólico produzido pela administração de isoproterenol. É importante salientar que, no mesmo período de avaliação, animais tornados imunologicamente tolerantes aos antígenos cardíacos previamente a indução da lesão miocárdica, apresentaram fração de ejeção preservada (Figura 9A) e volume sistólico final (VSF) semelhante ao fisiológico (Tabela I) (TOL+ISO: 74.3% \pm 4.4; $P < 0,05$ quando comparado ao grupo ISO).

Figura 9. Parâmetros hemodinâmicos basais medidos 3 dias após a indução da lesão cardíaca do tipo infarto.



Os gráficos representam a média \pm E.P.M. obtidos de 8-10 animais por grupo. Teste estatístico: ANOVA de uma via, seguido de teste *post hoc* de Tukey. CTR: barras abertas, animais *naïve*; grupo ISO: barras fechadas, animais injetados com isoproterenol como modelo de infarto do miocárdio, conforme detalhado na seção Métodos; grupo TOL+ISO: barras hachuradas, animais tratados por via oral com extrato cardíaco para indução de tolerância imunológica 7 dias antes da administração de isoproterenol. O símbolo * representa $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e, # representa $p < 0,05$ em relação ao grupo ISO.

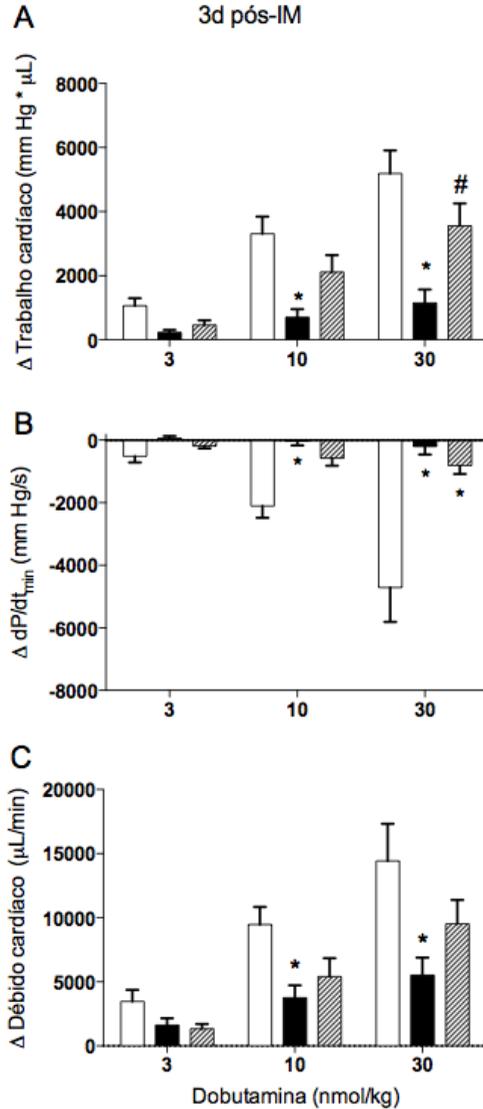
Tabela 1. Parâmetros hemodinâmicos: valores basais.

Parâmetro	CTR	ISO 3d	TOL+ISO 3d	ISO 15d	TOL+ISO 15d
FC (bpm)	264 ± 6	299 ± 22	255 ± 7	262 ± 6	256 ± 5
PSF (mmHg)	99,4 ± 4,3	93,20 ± 7,5	92,3 ± 3,9	104,1 ± 3,7	110,9 ± 5,6
PDF (mmHg)	7,7 ± 1,2	12,2 ± 1,3	10,7 ± 1,2	9,4 ± 1,5	12,7 ± 1,7*
VSF (µL)	43,1 ± 3,9	92,9 ± 22,4*	22,7 ± 4,8	98,8 ± 26,3*	40,1 ± 5,8
VDF (µL)	108,10 ± 16,8	133,2 ± 21,6	85,9 ± 9,8	146,7 ± 25,3	80,3 ± 12,6
VE (µL)	88,3 ± 11,6	51,9 ± 4,4	65,6 ± 9,5	67,9 ± 6,6	52,7 ± 5,2
DC (mL/min)	21,7 ± 3,1	15,9 ± 2,3	17,1 ± 2,6	17,9 ± 2,0	14,0 ± 2,8
dP/dt_{max} (mmHg/s)	7674 ± 302	6575 ± 1053	6296 ± 469	7593 ± 239	7831 ± 497
E_a (mmHg/µL)	1,44 ± 0,21	1,84 ± 0,14	1,81 ± 0,51	1,77 ± 0,31	2,34 ± 0,3*

FC: frequência cardíaca; PSF: pressão sistólica final; PDF: pressão diastólica final; VSF: volume sistólico final; VDF: volume diastólico final; VE: volume de ejeção; DC: débito cardíaco; dP/dt_{max}: pico de pressão intraventricular positiva desenvolvida ao longo do tempo; E_a: elastância arterial. Os valores representam a média ± E.P.M. de 8-10 animais por grupo, medidos 3 e 15 dias após a indução da lesão cardíaca do tipo infarto. Teste estatístico: ANOVA de uma via, seguido de teste *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Em seguida, com a finalidade de se verificar a reserva cardíaca, a resposta à estimulação com o agonista beta-adrenérgico dobutamina (3, 10 e 30 nmol/Kg, i.v.), foi avaliada. Como pode ser observado na Figura 10, os animais do grupo controle apresentaram, de forma dose-dependente, aumento do trabalho cardíaco, do dP/dt_{min} , e do débito cardíaco, em resposta à administração de dobutamina. Por outro lado, os animais do grupo ISO apresentaram um severo comprometimento no desenvolvimento desta resposta, enquanto que os animais do grupo TOL+ISO apresentaram capacidade parcialmente preservada para o desenvolvimento da mesma. O tratamento oral com antígenos cardíacos previamente a indução da lesão isquêmica foi capaz de impedir a perda da capacidade de resposta à estimulação com dobutamina no que diz respeito aos parâmetros trabalho cardíaco (índice sistólico) e débito cardíaco, no entanto, o mesmo não foi observado em relação ao índice diastólico dP/dt_{min} . Os demais resultados obtidos após a administração de dobutamina encontram-se listados na Tabela II.

Figura 10. Parâmetros hemodinâmicos medidos após a estimulação com dobutamina, 3 dias após a indução da lesão isquêmica.



Os gráficos representam a média \pm E.P.M. obtidos de 8-10 animais por grupo. Teste estatístico: ANOVA de duas vias, seguido de teste *post hoc* de Tukey. CTR: barras abertas, animais naïve; grupo ISO: barras fechadas, animais injetados com isoproterenol como modelo de infarto do miocárdio, conforme

detalhado na seção Métodos; grupo TOL+ISO: barras hachuradas, animais tratados por via oral com extrato cardíaco para indução de tolerância imunológica 7 dias antes da administração de isoproterenol. O símbolo * representa $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e, # representa $p < 0,05$ em relação ao grupo ISO.

Tabela 2. Parâmetros hemodinâmicos: valores após estimulação com dobutamina 30 nmol/Kg (apresentados como Δ da resposta).

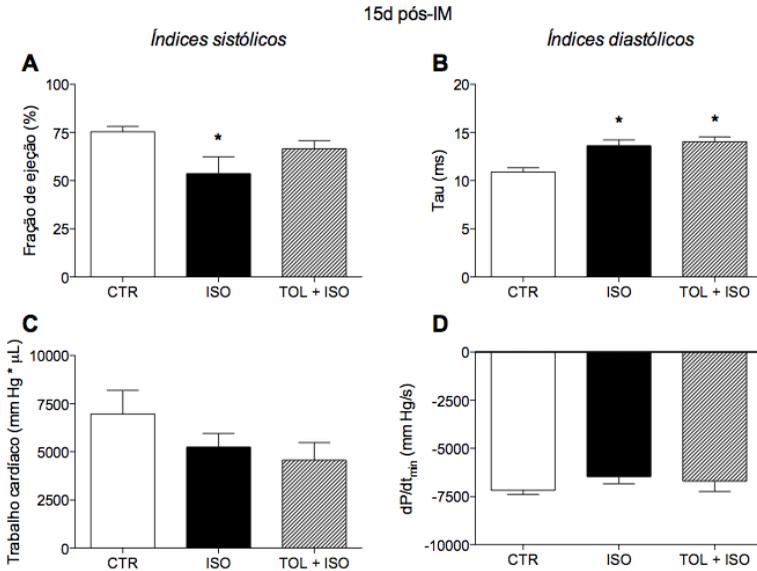
Parâmetro	CTR	ISO 3d	TOL+ISO 3d	ISO 15d	TOL+ISO 15dd
FC (bpm)	69 \pm 12	23 \pm 5*	42 \pm 8	64 \pm 10	68 \pm 15
PSF (mmHg)	46,5 \pm 11	11,8 \pm 4,0*	26,1 \pm 6,6	36,5 \pm 9,1	40,4 \pm 6,7
PDF (mmHg)	-0,46 \pm 0,5	1,2 \pm 0,6	0,20 \pm 1,7	-0,58 \pm 0,7	-1,7 \pm 0,8
VSF (μL)	-14,7 \pm 4,4	-10,2 \pm 2,6	-16,7 \pm 5,5	-15,8 \pm 3,3	-14,5 \pm 5
VDF (μL)	6,7 \pm 8,7	-2,6 \pm 4,1	-6,4 \pm 3,4	-5,7 \pm 3,3	0,9 \pm 3,7
VE (μL)	22,2 \pm 4,6	8,3 \pm 3,3*	22,2 \pm 3,8	11,7 \pm 4,8	14,5 \pm 3,2
dP/dt_{max} (mmHg/s)	0,05 \pm 0,07	-0,001 \pm 0,13	-0,01 \pm 0,18	0,22 \pm 0,15	0,15 \pm 0,09
E_a (mmHg/μL)	69 \pm 12	23 \pm 5*	42 \pm 8	64 \pm 10	68 \pm 15

FC: frequência cardíaca; PSF: pressão sistólica final; PDF: pressão diastólica final; VSF: volume sistólico final; VDF: volume diastólico final; VE: volume de ejeção; DC: débito cardíaco; dP/dt_{max}: pico de pressão intraventricular positiva desenvolvida ao longo do tempo; E_a: elastância arterial. Os valores representam a média \pm E.P.M. de 8-10 animais por grupo, medidos 3 e 15 dias após a indução da lesão cardíaca do tipo infarto. Teste estatístico: ANOVA de uma via, seguido de teste *post hoc* de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Quinze dias após a indução da lesão miocárdica (segunda administração de isoproterenol), as disfunções sistólica e diastólica cardíacas continuaram sendo observadas nos animais do grupo ISO, tanto em condições basais quanto após a estimulação com dobutamina (Figuras 11 e 12 e Tabelas I e II). Neste mesmo momento de avaliação, o tratamento imunológico com antígenos cardíacos impactou de forma diferenciada nos parâmetros funcionais sistólicos e diastólicos cardíacos. Por um lado, os animais do grupo TOL+ISO, sob condições basais, continuaram apresentando valores fisiológicos de fração de ejeção (Figura 11A). Porém, a disfunção diastólica pôde ser evidenciada através do aumento do tempo necessário para ocorrer a redução de 50% do relaxamento ventricular máximo (*Tau*) (Figura 11B) sendo que, os resultados obtidos com as medidas de pressão diastólica final (PDF) e elastância arterial confirmam essa observação (Tabela II).

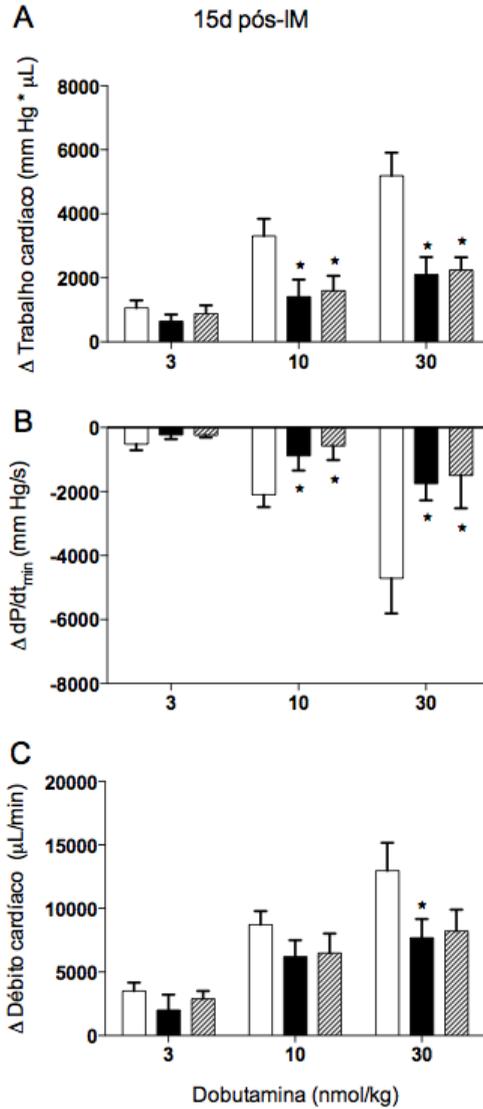
Cabe mencionar que, muito embora sob condições basais a função sistólica cardíaca dos animais do grupo TOL+ISO estivesse preservada, o tratamento imunológico utilizado não foi capaz de manter a reserva cardíaca nos animais deste grupo, os quais responderam à estimulação com dobutamina de forma semelhante aos animais do grupo ISO (Figura 12 e Tabela II).

Figura 11. Parâmetros hemodinâmicos basais medidos 15 dias após a indução da lesão isquêmica.



Os gráficos representam a média \pm E.P.M. obtidos de 8-10 animais por grupo. Teste estatístico: ANOVA de uma via, seguido de teste *post hoc* de Tukey. CTR: barras abertas, animais naïve; grupo ISO: barras fechadas, animais injetados com isoproterenol como modelo de infarto do miocárdio, conforme detalhado na seção Métodos; grupo TOL+ISO: barras hachuradas, animais tratados por via oral com extrato cardíaco para indução de tolerância imunológica 7 dias antes da administração de isoproterenol. O símbolo * representa $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Figura 12. Parâmetros hemodinâmicos medidos após a estimulação com dobutamina, 15 dias após a indução da lesão cardíaca do tipo infarto.



Os gráficos representam a média \pm E.P.M. obtidos de 8-10 animais por grupo. Teste estatístico: ANOVA de duas vias, seguido de teste *post hoc* de Tukey. CTR: barras abertas, animais *naïve*; grupo ISO: barras fechadas, animais injetados com isoproterenol como modelo de infarto do miocárdio, conforme

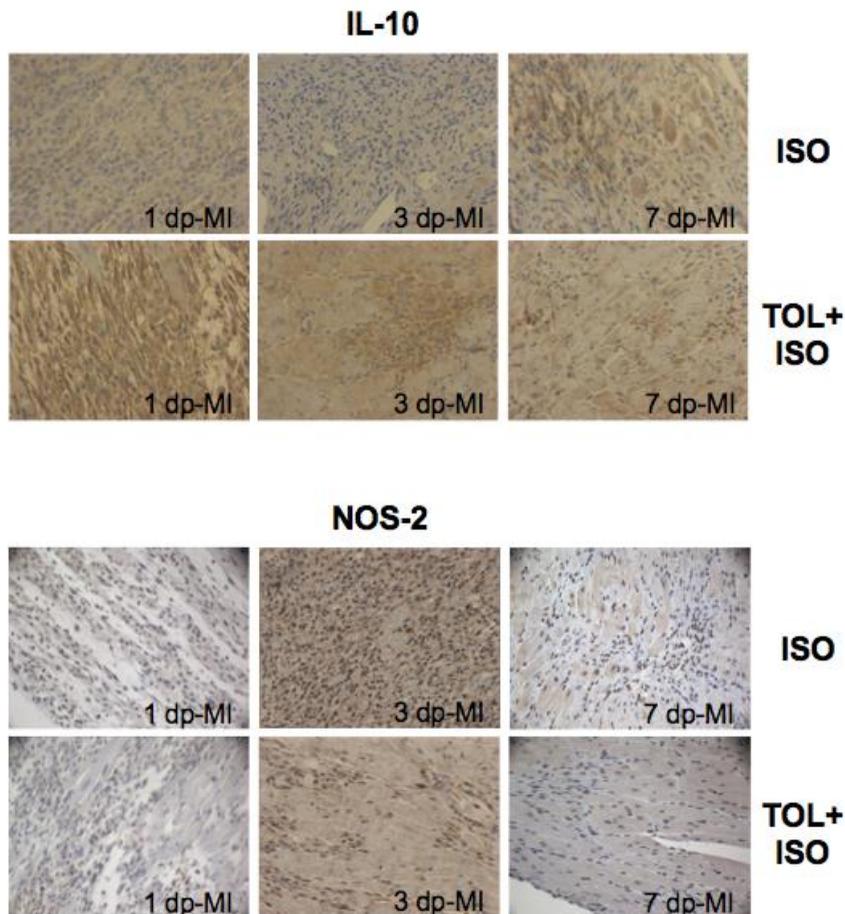
detalhado na seção Métodos; grupo TOL+ISO: barras hachuradas, animais tratados por via oral com extrato cardíaco para indução de tolerância imunológica 7 dias antes da administração de isoproterenol. O símbolo * representa $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e, # representa $p < 0,05$ em relação ao grupo ISO.

4.2 PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS

A administração de isoproterenol induziu uma maciça infiltração de leucócitos no miocárdio infartado, tendo início logo no primeiro dia (após segunda administração de isoproterenol) (Figura 13). O pico máximo do infiltrado inflamatório ocorreu 3 dias após a indução da lesão isquêmica, sendo primariamente constituído por células pró-inflamatórias positivamente marcadas para NOS-2 e fosfo-NF-kB-P65 (Figuras 13 e 14). Sete dias após a administração de isoproterenol, houve uma redução no número total de células infiltradas, assim como na expressão de mediadores pró-inflamatórios (Figura 13). Neste mesmo momento de avaliação, começou-se a observar a presença de células positivamente marcadas para IL-10 e arginase-1, evidenciando o início do processo de resolução da inflamação.

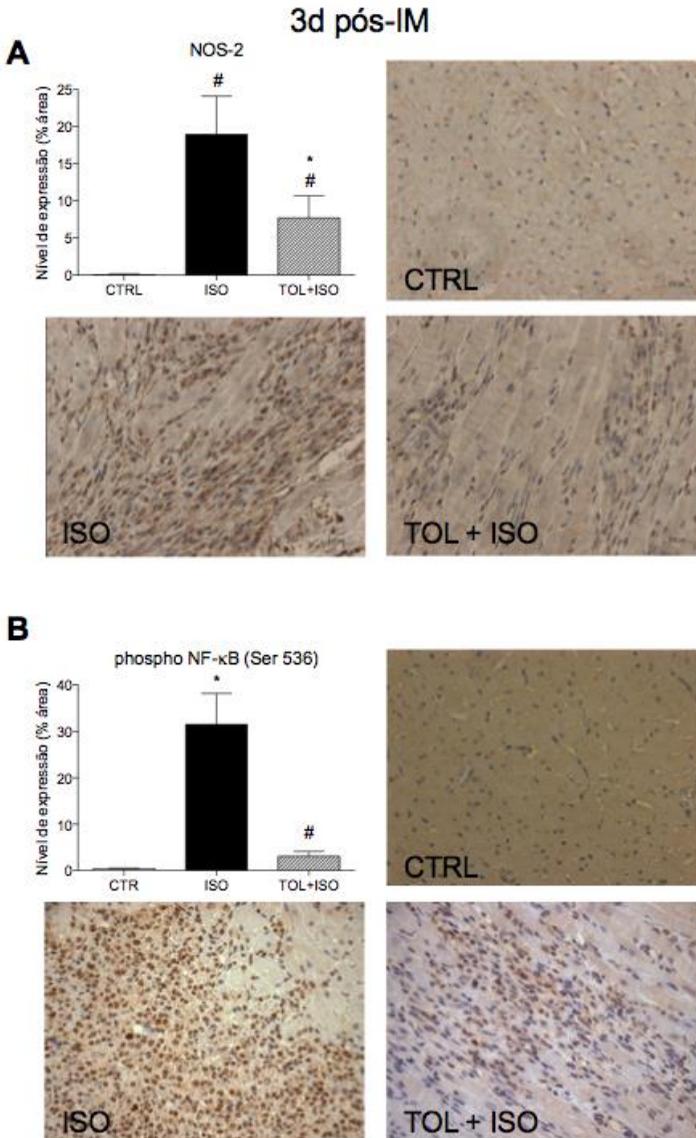
Interessantemente, a cinética da fase de resolução da inflamação apresentou-se completamente alterada nos animais do grupo TOL+ISO, a qual ocorreu de forma adiantada. Enquanto que a maior parte das células infiltradas no miocárdio dos animais do grupo ISO, 3 dias após a indução da lesão cardíaca do tipo infarto, constituíam em células positivamente marcadas para NOS-2, a maior parte do infiltrado celular nos animais do grupo TOL+ISO constituíam em células positivamente marcadas para IL-10 (Figuras 13 e 15). Faz-se necessário mencionar que, no infiltrado miocárdico dos animais do grupo TOL+ISO, 1 dia após a indução da lesão cardíaca já era possível observar células positivamente marcadas para IL-10 (Figura 13).

Figura 13. Fotos representativas dos principais achados imuno-histoquímicos.



Fotos representativas dos principais achados imuno-histoquímicos, revelando os perfis temporais de expressão de interleucina-10 (IL-10) (painel superior), e enzima óxido nítrico sintase-2 (NOS-2) (painel inferior) nos grupos ISO (animais injetados com isoproterenol como modelo de infarto do miocárdio, conforme detalhado na seção Métodos), e TOL+ISO (animais tratados por via oral com extrato cardíaco para indução de tolerância imunológica 7 dias antes da administração de isoproterenol). As imagens são apresentadas com aumento de 200 vezes.

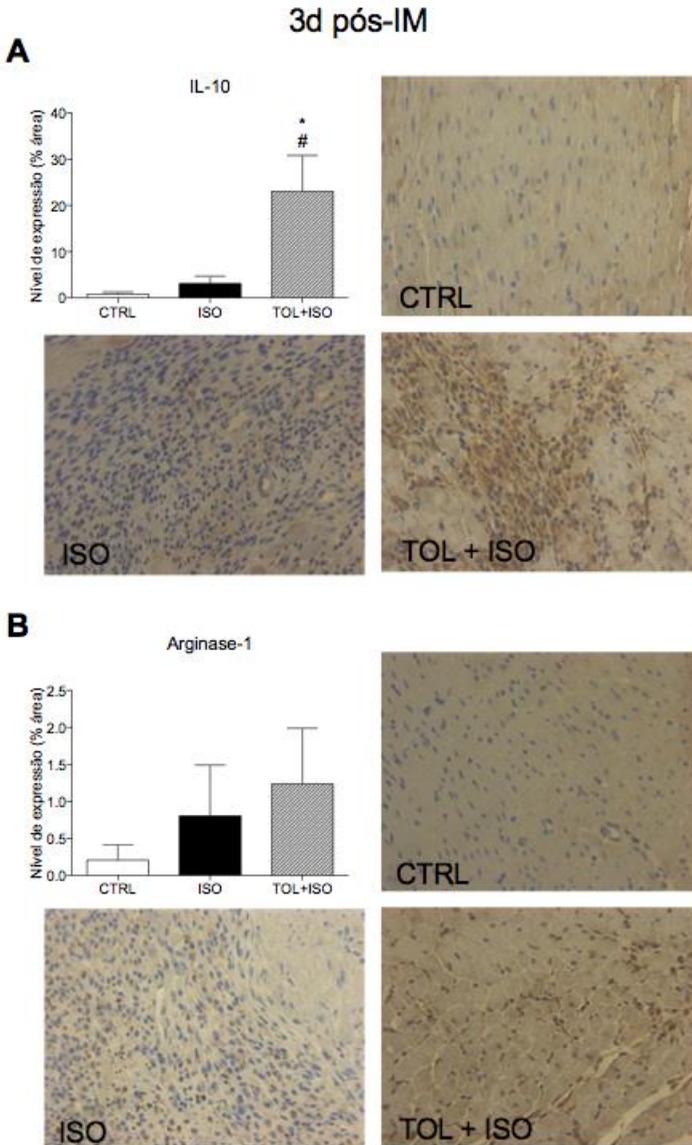
Figura 14. Nível de expressão de mediadores pró-inflamatórios no coração.



Cortes histológicos do miocárdio dos animais dos três grupos (CTR, ISO e TOL+ISO) foram obtidos 3 dias após a administração de isoproterenol. A análise imunohistoquímica foi realizada para NOS-2 (Painel A) e fosfo-NF- κ B-P65 (Ser 536; Painel B). São mostradas imagens representativas de cada um dos grupos. Os gráficos representam a média \pm E.P.M. obtidos de 4 animais por

grupo. Teste estatístico: ANOVA de uma via. CTR: barras abertas, animais *naïve*; grupo ISO: barras fechadas, animais injetados com isoproterenol como modelo de infarto do miocárdio; grupo TOL+ISO: barras hachuradas, animais tratados por via oral com extrato cardíaco para indução de tolerância imunológica 7 dias antes da administração de isoproterenol. O símbolo * representa $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e, # representa $p < 0,05$ em relação ao grupo ISO.

Figura 15. Nível de expressão de mediadores anti-inflamatórios no coração.



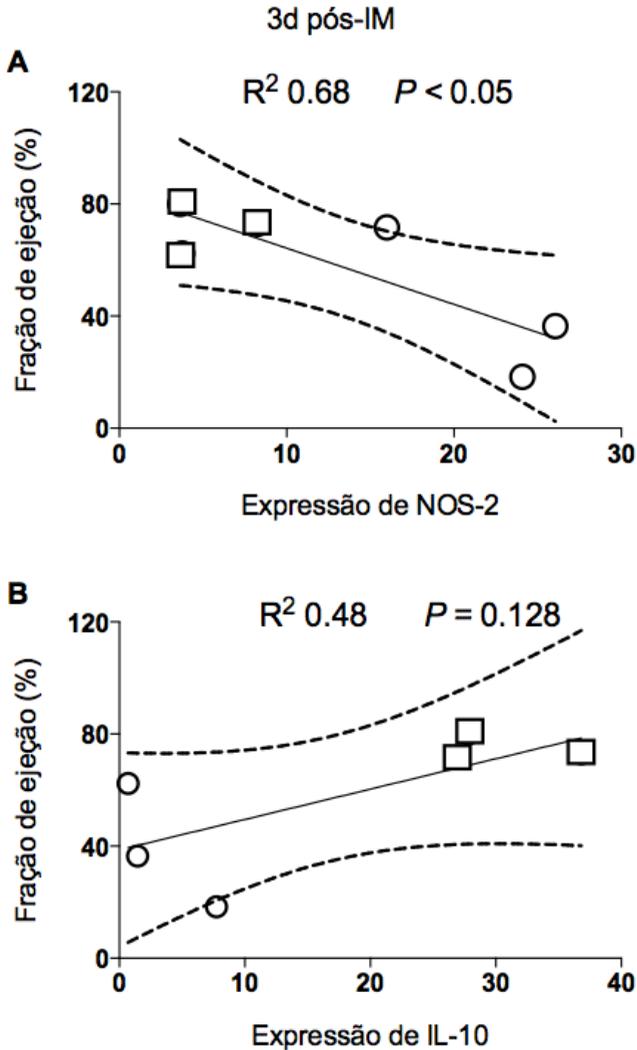
Cortes histológicos do miocárdio dos animais dos três grupos (CTR, ISO e TOL+ISO) foram obtidos 3 dias após a administração de isoproterenol. A análise imunohistoquímica foi realizada para IL-10 (Painel A) e arginase-1 (Painel B). São mostradas imagens representativas de cada um dos grupos. Os

gráficos representam a média \pm E.P.M. obtidos de 4 animais por grupo. Teste estatístico: ANOVA de uma via. CTR: barras abertas, animais *naïve*; grupo ISO: barras fechadas, animais injetados com isoproterenol como modelo de infarto do miocárdio; grupo TOL+ISO: barras hachuradas, animais tratados por via oral com extrato cardíaco para indução de tolerância imunológica 7 dias antes da administração de isoproterenol. O símbolo * representa $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e, # representa $p < 0,05$ em relação ao grupo ISO.

Através da comparação entre os resultados histológicos e hemodinâmicos encontrados para cada animal avaliado individualmente 3 dias após a indução da lesão miocárdica, observou-se que o nível de expressão celular da isoforma NOS-2 se correlacionou negativamente com a fração de ejeção cardíaca ($P < 0.05$). No entanto, quando a mesma comparação foi realizada para a expressão celular de IL-10 e fração de ejeção, observou-se apenas uma tendência indicativa de que quanto maior o nível de expressão deste mediador anti-inflamatório, melhor o desempenho cardíaco no que diz respeito a fração de ejeção.

Essa correlação entre parâmetros imunológicos e funcionais pode ser útil, pelo menos em parte, para explicar como a tolerância imunológica aos componentes cardíacos previamente a administração de isoproterenol é capaz de promover uma melhor recuperação funcional cardíaca após um episódio do tipo infarto miocárdico, quando os resultados destes animais são comparados aos dos animais que não receberam este mesmo tratamento (Figura 16).

Figura 16. Análise da correlação entre fração de ejeção (%) e expressão dos mediadores inflamatórios 3 dias após a indução da lesão miocárdica.



Cada ponto representa os valores de fração de ejeção e nível de expressão de NOS-2 (A) ou nível de expressão de IL-10 (B) obtidos do mesmo animal. Os círculos representam os valores obtidos dos animais do grupo ISO, enquanto os quadrados representam os valores obtidos dos animais do grupo TOL+ISO. A linha sólida representa a regressão linear, enquanto que as linhas tracejadas

representam o intervalo de confiança de 95%, calculados considerando-se os grupos conjuntos.

5 DISCUSSÃO

5.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O MODELO EXPERIMENTAL

No presente trabalho a administração de isoproterenol, uma catecolamina sintética estruturalmente relacionada à adrenalina, foi utilizada para induzir uma lesão cardíaca semelhante ao infarto (*infarct-like lesion*). Este protocolo foi originalmente desenvolvido por Rona e colaboradores (1959) e está muito bem estabelecido na literatura (CHAPPEL *et al.*, 1959; BEZNAK, 1962; CAMPOS *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*, 2012;). A administração de catecolaminas exógenas começou a ser utilizada visando-se estabelecer um modelo animal de isquemia e de lesão do tipo infarto do miocárdio que apresentassem analogia à condição humana.

Agonistas β -adrenérgicos, como o isoproterenol, possuem ações cronotrópicas e inotrópicas positivas, promovendo um aumento significativo no débito cardíaco (uma ação mediada por receptores beta-1). Esse aumento no trabalho cardíaco promove uma maior demanda de consumo de oxigênio, além de ser responsável por causar depleção nas reservas energéticas dos cardiomiócitos. Concomitante aos seus efeitos cardíacos, o isoproterenol promove relaxamento vascular e significativa hipotensão (via receptores beta-2), inclusive na circulação coronariana. Esse desacoplamento entre oferta e demanda de oxigênio e nutrientes no músculo cardíaco resulta em uma isquemia miocárdica sustentada, resultando assim, em uma lesão com características anatômicas semelhantes ao infarto agudo do miocárdio (RONA *et al.*, 1959; CAMPOS, 2008).

O mecanismo exato através do qual o isoproterenol induz as lesões miocárdicas ainda não está totalmente esclarecido mas o desequilíbrio entre demanda e oferta de oxigênio *versus* hipotensão e hiperatividade miocárdica acima mencionado é considerado atualmente como a principal explicação para as mudanças morfológicas observadas no coração (GRIMM *et al.*, 1998). Além deste todavia, outros fatores são apontados e, dentre eles, estão os achados de Milei e Rapaport (1976) que demonstraram que as catecolaminas podem exercer efeitos cardiotoxicos *per se* ao promoverem alterações na permeabilidade das membranas dos cardiomiócitos. Outros trabalhos demonstraram ainda que as catecolaminas podem interferir com o controle iônico de Ca^{++} e K^+ no músculo cardíaco (SINGAL *et al.*, 1981), aumentar significativamente a produção de radicais livres e promover maior estresse oxidativo (MOHAN e BLOON, 1999).

Medidas hemodinâmicas realizadas neste trabalho confirmam uma significativa e duradoura perda da funcionalidade cardíaca nos animais do grupo ISO (tanto 3 quanto 15 dias após a indução da lesão cardíaca isquêmica). A deterioração no funcionamento cardíaco observada nestes animais resultou de importante declínio de ambas funções sistólica e diastólica, tanto sob condições basais quanto após estimulação com dobutamina. Concomitantemente à severa disfunção cardíaca observada, análises histológicas mostraram que uma resposta inflamatória distribuía-se por grandes áreas do miocárdio.

A correlação morfofuncional 3 dias após a indução da lesão cardíaca nos animais do grupo ISO, foi bastante clara em apontar que o maior prejuízo motor coincidiu com o pico de atividade inflamatória aguda, e que houve uma forte correlação entre o fenótipo das células inflamatórias encontradas no infiltrado celular e a performance cardíaca, o que será discutido em detalhes a seguir.

De acordo com dados prévios do nosso (RAMOS *et al.*, 2012) e de outros grupos (RONA *et al.*, 1959; CAMPOS *et al.*, 2008), a lesão miocárdica provocada pelo isoproterenol frequentemente localiza-se no ápice cardíaco e músculos papilares, abrangendo predominantemente as regiões subendocárdicas do ventrículo esquerdo. As lesões necróticas provocadas pelo isoproterenol mostraram-se focais, e caracterizadas por edema intracelular e intercelular, além de apresentarem um grande número de células inflamatórias (RAMOS *et al.*, 2012). Encontra-se na literatura ainda, que microscopicamente pode-se observar dilatação capilar, desintegração granular ou necrose hialina de miofibras e lise das miofibrilas, caracterizada pelo desaparecimento focal de células miocárdicas (RONA *et al.*, 1959; CHAPPEL *et al.*, 1959; RONA *et al.*, 1963).

De acordo com Rona e colaboradores (1959; 1963), as alterações que ocorrem nos diferentes tecidos de ratos injetados com altas doses de isoproterenol é um fenômeno criticamente dependente da concentração administrada desta droga. Segundo estes autores, quando administrado em concentrações até 322 mg/Kg, o isoproterenol produz alterações necróticas exclusivamente no tecido cardíaco, ainda que, eventualmente, o edema pulmonar possa ser observado. Em contrapartida, quando administrado em concentrações que variavam entre 322-685 mg/Kg, lesões necróticas nos rins, fígado, e vísceras abdominais podem ocorrer. Em ambos trabalhos realizados por nosso grupo, a concentração de isoproterenol utilizada não ultrapassou 150 mg/Kg, e muito embora o coração tenha sido o único órgão avaliado histologicamente (no

primeiro trabalho realizado), de acordo com os dados citados acima, é pouco provável que lesões necróticas extra-cardíacas tenham ocorrido.

Uma vez mencionados importantes aspectos do modelo experimental de lesão cardíaca induzida através da administração de altas doses de isoproterenol e estabelecidas características cinéticas desta lesão, bem como as correlações morfofuncionais desta situação experimental, prosseguiu-se com a investigação sobre como a atividade imune-inflamatória toma parte nos fenômenos pós-lesão miocárdica.

5.2 ABORDAGEM TERAPÊUTICA PREVENTIVA: TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA A ANTÍGENOS CARDÍACOS

No presente trabalho encontramos que o protocolo de tolerância imunológica aos antígenos cardíacos, quando realizado previamente à indução da lesão isquêmica do miocárdio, foi capaz de impedir a deterioração funcional do coração quando no estado basal, bem como diminuir o processo inflamatório desencadeado pela necrose dos cardiomiócitos.

No entanto, antes de se seguir com a discussão sobre os nossos achados com o grupo TOL+ISO, é necessário fazer uma melhor contextualização do racional que permeia a nossa escolha desta abordagem terapêutica, bem como discutir achados prévios que validam o protocolo aqui empregado.

5.2.1 Importância dos linfócitos no reparo tecidual cardíaco após lesão isquêmica

Por ocasião de uma isquemia miocárdica e após a necrose de cardiomiócitos, componentes intracelulares são liberados para o compartimento extracelular e para a circulação sistêmica. Desta forma, a exposição de proteínas citoplasmáticas cardíacas (ou proteínas presentes em compartimentos sub-celulares) acaba acontecendo em um contexto tecidual necrótico e inflamatório encontrado no miocárdio lesado. Esse microambiente “inflamado” pode favorecer o desenvolvimento de uma atividade imune específica contra componentes do coração, incluindo a produção de auto-anticorpos e a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ contra epítomos cardíacos (VARDA-BLOOM, 2000; MATZINGER, 2007).

Muito embora o desenvolvimento da autoimunidade a antígenos cardíacos no contexto de uma doença miocárdica (incluindo o infarto) seja reconhecido há alguns anos (MAISEL *et al.*, 1998), a possível

associação entre uma atividade autoimune patogênica aos componentes cardíacos e a inflamação que toma parte no pós-infarto foi proposta apenas recentemente (FRANTZ e HOFMANN, 2015).

Neste sentido, Maisel e colaboradores (1998) mostraram que a transferência adotiva de linfócitos obtidos a partir do baço de camundongos infartados (obstrução das coronárias), para animais saudáveis singênicos, promoveu miocardite autoimune mediada por células T e disfunção contrátil do miocárdio. Este foi o trabalho inaugural mostrando evidências *in vivo* de linfócitos mediando dano miocárdio de animais não infectados e não imunizados. A partir daí, diferentes grupos, incluindo o nosso, tem demonstrado que tanto linfócitos T quanto linfócitos B participam do reparo tecidual e do desenvolvimento de falência cardíaca após um episódio de infarto (VARDA-BLOON *et al.*, 2000; LIAO e CHENG, 2006; GOODCHILD *et al.*, 2009; CURATO *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2012; YAN *et al.*, 2012; HOFMANN *et al.*, 2012; LAROUMANIE *et al.*, 2014; WEIRATHER *et al.*, 2014; ZOUGARI *et al.*, 2014; FRANTZ e HOFMANN, 2015).

No trabalho de Varda-Bloom e colaboradores (2000) foi observado que em um modelo murino de infarto miocárdico, ocorreu a proliferação de linfócitos T CD8⁺ auto-reativos, e que esses linfócitos foram capazes de promover necrose de um número ainda maior de cardiomiócitos, além daqueles primariamente afetados pela isquemia miocárdica. Ainda, o trabalho de Ramos e colaboradores (2012) demonstrou que a lesão induzida por isoproterenol é capaz de promover a ativação de linfócitos contra proteínas solúveis do miocárdio, e que esta ativação se correlacionou com a fibrose adversa.

Os dados experimentais mencionados até aqui tornam evidente que linfócitos ativados no contexto do infarto miocárdico podem promover um dano tecidual ainda maior, contribuindo assim para um mau prognóstico. Uma interpretação simplista destes achados poderia levar à conclusão equivocada de que uma completa inibição da atividade imune pós-infarto possa se configurar como uma alternativa terapêutica. No entanto cabe ressaltar que, se por um lado a presença exacerbada, persistente, ou mal-direcionada de eventos imune-inflamatórios mostra-se potencialmente deletéria constituindo em um fator limitante à restituição miocárdica adequada (LIAO e CHENG, 2006), por outro lado é evidente que diversos eventos inflamatórios são imprescindíveis para que o processo de cicatrização tecidual aconteça. O processo inflamatório é parte indissociável da reconstrução do organismo. Assim do mesmo modo como ela pode ser restritiva ao reparo, a inibição

indiscriminada da atividade imuno-inflamatória pós-infarto miocárdico é extremamente prejudicial e não permite sequer a formação de um tecido cicatricial (KLONER *et al.*, 1978a).

É consenso na literatura que a imunossupressão não é a alternativa adequada para promover o reparo miocárdico, visto que sabe-se há alguns anos que a terapia com glicocorticoides resulta em efeitos danosos ao processo de reparo tecidual cardíaco, além de resultar em um maior índice de mortalidade (KLONER *et al.*, 1978b). Isto ocorre assim porque a inflamação, apesar de potencialmente danosa, é parte fundamental do processo de reparo (NAHRENDORF *et al.*, 2007; FRANTZ *et al.*, 2013). Os mesmos leucócitos que podem causar necrose de cardiomiócitos também são responsáveis por remover o debris celular, promover angiogênese, e reestruturar a matriz extracelular.

Além disso, é interessante mencionar que um estudo realizado em camundongos transgênicos completamente desprovidos de linfócitos T CD4⁺ apresentou resultados muito semelhantes aos de pacientes infartados tratados com glicocorticoides, uma vez que estes animais apresentaram um maior índice de mortalidade e um reparo tecidual cardíaco insuficiente (HOFMANN *et al.*, 2012).

Alguns grupos de pesquisa demonstraram que, além de linfócitos com potencial autodestrutivo, o infarto do miocárdio também mobiliza a ativação e recrutamento de linfócitos com perfil anti-inflamatório, os quais desempenham um papel fundamental na resolução da inflamação mio-isquêmica. Assim, estudos recentes demonstraram que a ativação de uma subpopulação de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺ que expressam IL-10 e TGF-beta é importante para modular a plasticidade fenotípica de macrófagos, dirigindo-os a uma polarização tipo M2 (pró-reparo tecidual) (WEIRATHER *et al.*, 2014). Além disso, CURATO e colaboradores (2010) descreveram uma subpopulação inédita de linfócitos CD8⁺ e CD4⁺ Foxp3⁺ que expressam receptores de angiotensina-II e que secretam IL-10 no miocárdio lesado (angiotensina-II é um fator vasoconstritor bastante presente nas respostas cardiovasculares pós-infarto).

Em conjunto, esses dados deixam clara a necessidade de mais estudos acerca da relação resposta imunológica/reparo tecidual cardíaco após um episódio de infarto miocárdico. Ainda, os dados apontam que alternativas terapêuticas que busquem modular a atividade imune pós-infarto podem ter relevância clínica. Recentemente alguns autores têm proposto desenvolver terapias anti-citocinas específicas, de modo a

inibir apenas alguns aspectos da imunidade pós-infarto (YU *et al.*, 2005).

Em nosso grupo, acreditamos que uma segunda linha possível de se abordar esse problema seja buscando-se desenvolver (ou reforçar) a tolerância imunológica aos componentes imunogênicos do miocárdio antes do desenvolvimento da patogênese autoimune observada no período pós-infarto, e assim, reforçar a atividade pro-reparo dos linfócitos (e inibir seus aspectos patogênicos).

5.2.2 Validação do protocolo de tolerância oral

Diferentes grupos independentes, incluindo o nosso, descobriram que a tolerância imunológica aos antígenos cardíacos pode ser reforçada por meio do tratamento oral com proteínas cardíacas. Diversas manifestações de respostas imunes específicas testadas puderam ser suprimidas mediante diferentes regimes de administração oral dos antígenos. Surpreendentemente, já foi demonstrado que a ingestão oral de miosina (GONNELLA *et al.*, 2009), troponina (FRENKEL *et al.*, 2009), ou proteínas de choque térmico (MARON *et al.*, 2002), foi capazes de diminuir a resposta linfocitária contra o tecido miocárdico em diversas condições experimentais, incluindo miocardite autoimune (GONNELLA *et al.*, 2009), isquemia e reperfusão cardíaca (FRENKEL *et al.*, 2009), e aterosclerose (MARON *et al.*, 2002).

Com especial relevância para o presente trabalho, cabe mencionar que Ramos *et al.*, (2012), observaram que o tratamento oral com 20 mg de um extrato cardíaco realizado uma semana antes da indução das lesões miocárdicas com isoproterenol foi eficiente em inibir a proliferação de linfócitos contra antígenos cardíacos, e melhorar o reparo tecidual. Estes achados ajudam a validar o protocolo de tolerância imunológica utilizado neste estudo.

Considerando as evidências produzidas por nosso (RAMOS, *et al.*, 2012), e por outros grupos (FRENKEL, *et al.*, 2009), acreditamos poder afirmar que o tratamento oral com proteínas cardíacas utilizado no presente estudo é um protocolo capaz de reduzir (ou modificar) a resposta linfocitária a proteínas do coração. Com isso, seguimos com a discussão sobre como isso influencia o reparo e a função do miocárdio lesado.

5.2.3 Efeitos da tolerância oral a antígenos cardíacos sobre o reparo do miocárdio

No presente trabalho, observamos que a ingestão de um extrato tecidual contendo 20 mg de proteínas cardíacas uma semana antes da indução de lesões do tipo infarto foi eficaz em preservar a funcionalidade contrátil do coração lesado. Assim, uma avaliação hemodinâmica revelou que importantes parâmetros sistólicos encontram-se preservados nos animais do grupo TOL+ISO, quando comparados ao grupo ISO (fração de ejeção, Figura 9A, e volume sistólico final, Tabela I). Os índices diastólicos porém, encontram-se apenas parcialmente preservados, conforme mostrado nas Figuras 10B e D. Surpreendentemente, 15 dias após a indução do infarto miocárdico ainda pode-se observar que a função sistólica cardíaca basal permaneceu parcialmente preservada nos corações dos animais do grupo TOL+ISO (Figura 11A e C). Porém, este tratamento não foi capaz de prevenir o desenvolvimento de um prejuízo diastólico tardio (Figura 11B e D). Estes dados estão de acordo com dados prévios apresentados por nosso grupo onde observou-se capacidade normalizada dos corações dos animais do grupo TOL+ISO em gerar tensão em uma preparação de coração isolado e perfundido (preparação de *Langendorff*), sob condições basais, 3 e 14 dias após a indução de lesão semelhante ao infarto miocárdico (RAMOS *et al.*, 2012).

Faz-se necessário mencionar que, no presente trabalho confirmamos, refinamos e expandimos os dados previamente obtidos por Ramos e colaboradores (2012). Utilizamos aqui uma ferramenta experimental ainda mais acurada, um catéter intraventricular que permite avaliar as relações de pressão e volume a cada ciclo cardíaco. Com isso pudemos distinguir melhor os efeitos sistólicos e diastólicos deste tratamento. Além disso, ao realizar avaliações hemodinâmicas do coração desafiado com dobutamina, fomos capazes de acessar a reserva cardíaca dos animais, algo que até onde sabemos, foi descrito pela primeira vez neste contexto. A dobutamina é um agonista adrenérgico com ação preferencial em receptores beta-1 cardíacos, e é um fármaco utilizado de forma padrão no estudo das funções do coração sob estresse tanto em modelos experimentais (GONÇALVES *et al.*, 2014), quanto na clínica (quando o paciente é impedido de realizar o teste ergonômico) (KÜHL e HANRATH, 1998). Com esta abordagem observamos que 3 dias após a indução da lesão isquêmica, o protocolo de tolerância oral foi capaz de manter parcialmente a reserva cardíaca (grupo TOL + ISO) (índices sistólicos, porém não os índices diastólicos) após a estimulação com dobutamina (Figura 10 e Tabela II). Porém, quando estimulados com dobutamina 15 dias após a indução da lesão isquêmica, observamos

que o protocolo de tolerância oral não foi capaz de manter a reserva cardíaca nos corações dos animais submetidos a este tratamento.

Acreditamos que os benefícios sistólicos obtidos neste trabalho estão diretamente relacionados com a intensidade da inflamação cardíaca. Diversos trabalhos já demonstraram que citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa, IL-1beta, ou uma elevada expressão cardíaca de NOS-2 podem provocar prejuízo sistólico cardíaco (ELAHI *et al.*, 2006; GORDON *et al.*, 2011). Nossos dados de correlação entre a expressão de NOS-2 e fração de ejeção apontam nesta direção. Além da medida dos níveis de expressão de NOS-2, acreditamos que os dados aqui obtidos com a p65 fosforilada também corroboram este argumento, pois a ativação da via NF-kB promove aumento na expressão gênica de TNF-alfa e IL-1beta (GORDON *et al.*, 2011), fatores que também podem promover prejuízo sistólico cardíaco (ELAHI *et al.*, 2006).

Foi demonstrado que a infusão de TNF-alfa (40-200 µg/Kg) é capaz de produzir disfunção ventricular esquerda, cardiomiopatia e manifestações clínicas semelhantes a falência cardíaca. Neste último caso, o dano ocorre visto que o TNF-alfa estimula a hipertrofia dos cardiomiócitos, além de promover o remodelamento cardíaco adverso por interferir na produção de metaloproteinases. Observou-se ainda, que o TNF-alfa foi capaz de promover a perda de cardiomiócitos, seja por necrose ou apoptose (ELAHI *et al.*, 2006). Alguns trabalhos sugerem que a depressão miocárdica produzida por esta citocina possa se dar via mecanismos envolvendo o NO (KALRA *et al.*, 2000).

Está bem estabelecido na literatura que o NO produz seus efeitos cardíacos de duas formas: (1) por meio da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel com subsequente formação de GMPc, o qual ativa proteína quinase G (PKG) e eventos dependentes da fosforilação de PKG, e (2) oxidação direta do grupamento tiol (S-nitrosilação). Em concentrações nanomolares de NO, níveis que são inferiores aos necessários para promover S-nitrosilação, este bloqueia a respiração mitocondrial através da inibição direta do citocromo-c-oxidase (IV complexo da respiração mitocondrial) (ELAHI *et al.*, 2006). Visto que os cardiomiócitos são células repletas de mitocôndrias, a disponibilidade do NO mesmo em concentrações nanomolares têm implicações significativas sobre a função miocárdica (ZHANG *et al.*, 2005). Além disso, as concentrações de NO interferem diretamente no processo de contração cardíaca, seja por interferir na concentração de cálcio transiente ou no processo de dessensibilização da maquinaria contrátil (ELAHI *et al.*, 2006). Por fim, foi mostrado que a ativação de NOS-2

induz efeito inotrópico negativo em cardiomiócitos isolados em cultura (HAYWOOD *et al.*, 1996).

Assim, nossos dados parecem ser claros neste contexto: animais com maior expressão de NOS-2 e fosforilação de p65 exibem maior prejuízo motor. A tolerância imunológica, ao promover uma redução na inflamação local, favoreceu a manutenção da função sistólica basal em níveis normais. O fato de este tratamento ter impacto menos na perda de reserva cardíaca é bastante compreensível, afinal de contas estes animais também sofreram infarto miocárdio. Sabe-se que a atividade linfocitária modula processos de reparo tecidual (horas e dias após o dano primário), mas sem impedir a necrose inicial de cardiomiócitos em resposta a isquemia extensa.

Cabe ressaltar que a menor expressão de NOS-2 e fosforilação da via NF- κ B encontrada nos animais tolerantes deve estar mais relacionada com maior eficiência dos mecanismos de resolução da inflamação encontrado nos animais do grupo TOL+ISO, e não meramente com ausência de resposta inflamatória. Observamos que os animais do grupo TOL+ISO também apresentam resposta pro-inflamatória inicial (NOS-2 e p65), porém esta foi acompanhada por rápido influxo de leucócitos positivamente marcados para IL-10, potente citocina anti-inflamatória.

A IL-10 pode ser considerada como importante agente no processo de resolução da inflamação. Originalmente chamada “fator inibidor da síntese de citocinas”, por sua habilidade em inibir a produção de interferon-gama e IL-2 em células Th2, a IL-10 é secretada por monócitos, macrófagos, mastócitos, linfócitos T e B e células dendríticas. Foi demonstrado que a IL-10 inibe, de forma muito eficaz, a produção de citocinas pró-inflamatórias como interferon-gama, TNF- α , IL-1 β , IL-6 bem como a de óxido nítrico em vários modelos de doenças experimentais (OGAWA *et al.*, 2008).

Em um trabalho recente, Casto-Junior *et al.*, (2013) buscou elucidar mecanismos e processos que expliquem a diferença entre animais imunes (desafio parenteral com antígenos em adjuvantes) e tolerantes (ingestão oral prévia ao desafio parenteral). Estes autores observaram que a principal diferença entre estes dois grupos não está em nenhum marcador específico, mas sim na cinética de expressão de mediadores pró- e anti-inflamatórios. Estes autores também observaram que animais tolerantes também inflamam, porém resolvem prontamente o processo inflamatório (*e.g.* expressão antecipada de IL-10). Por outro lado, animais imunes também expressam mediadores anti-inflamatórios, porém o fazem bem mais tardiamente. Em conformidade com estes

achados, ressaltamos que um dos achados mais surpreendentes de nosso estudo foi a intensa expressão de IL-10 no miocárdio de animais TOL+ISO, encontrada já no primeiro dia após a administração de isoproterenol.

Uma limitação de nosso trabalho é que não realizamos comarcações a fim de esclarecer quais células são as responsáveis pela expressão de NOS-2 e IL-10. Ainda assim, duas linhas de evidências nos fazem especular que se tratam de macrófagos. Por um lado, está bem esclarecido que a administração de isoproterenol promove um influxo majoritariamente composto por macrófagos (CAMPOS, 2008). Nas fases que se seguem após um episódio de infarto do miocárdio, os macrófagos com ativação do tipo clássica (perfil pró-inflamatório) e os macrófagos com ativação do tipo alternativa (perfil pró-reparo tecidual) são distintamente ativados/recrutados. Na fase inicial, a fase inflamatória, os macrófagos com ativação do tipo clássica são predominantemente ativados (apresentando elevado grau de fosforilação da via NF-kB, e expressando principalmente NOS-2, TNF-alfa, e IL-1beta). Porém, em momentos mais tardios, os macrófagos mudam seu perfil de ativação, passando a expressar mediadores anti-inflamatórios e pró-reparo tecidual. A expressão de IL-10 pelos macrófagos com perfil pró-reparo tecidual é crucial para delimitar a resposta inflamatória pós-infarto miocárdico e ainda, prevenir que ocorra uma expressão exacerbada do processo inflamatório para além das bordas da área infartada. Faz-se necessário mencionar que foi mostrado recentemente que a dinâmica temporal de polarização dos macrófagos (ativação do tipo clássica ou ativação do tipo alternativa) é fortemente influenciada pela atividade de células T CD4⁺ (WEIRATHER *et al.*, 2014). Neste cenário, foi demonstrado que células T reguladoras Foxp3⁺CD4⁺ parecem promover a ativação alternativa dos macrófagos, favorecendo a expressão de IL-10 e um processo de reparo tecidual mais adequado (WEIRATHER *et al.*, 2014). Considerando que os antígenos primariamente contatados pela mucosa intestinal também desencadeiam uma grande ativação das células T Foxp3⁺CD4⁺, é possível especular que essa relação Treg-M2 é, pelo menos em parte, responsável pelo perfil de expressão do mediador anti-inflamatório IL-10 que observamos durante o processo de reparo tecidual cardíaco nos animais do grupo TOL+ISO.

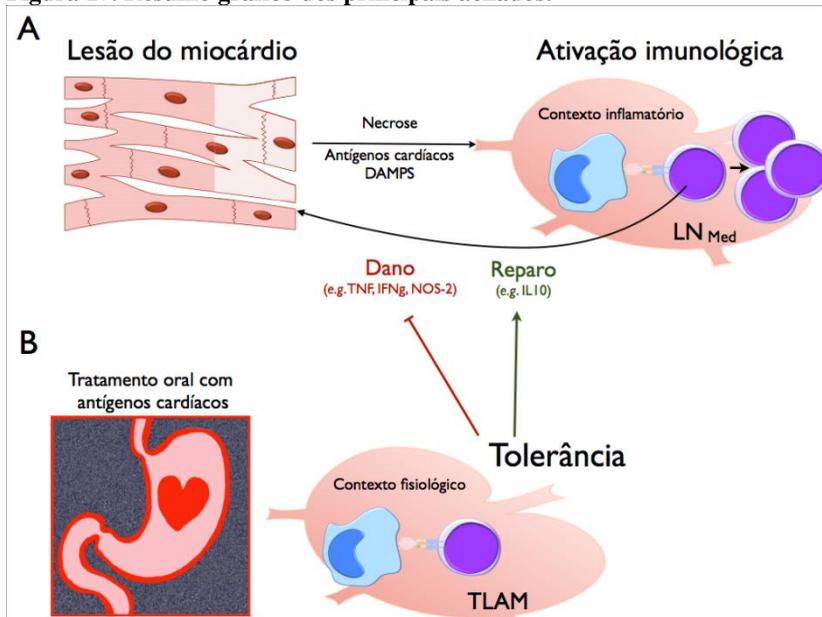
Por fim, cabe mencionar que abordagens semelhantes à nossa foram utilizadas com sucesso no tratamento de lesões estereis em diferentes tecidos. Frenkel e colaboradores (2003) em um modelo de acidente vascular cerebral onde a administração nasal de um antígeno

neural (glicoproteína da mielina dos oligodendrócitos - MOG) previamente à oclusão de uma artéria cerebral específica foi capaz de diminuir a inflamação isquêmica central, diminuir a área total da lesão e melhorar aspectos comportamentais dos animais pós-derrame cerebral. Ainda, Costa (2009) mostrou que em um modelo de lesão cutânea incisional, a indução de tolerância imunológica foi capaz de alterar a atividade linfocitária de tal modo que a deposição de colágeno (I e III), bem como a presença de miofibroblastos mostraram-se significativamente reduzidas, melhorando desta forma o aspecto fibrótico das lesões.

6 CONCLUSÕES

Em conjunto, os resultados obtidos no presente trabalho apontam indícios relevantes sobre como a tolerância oral aos antígenos cardíacos pode ser útil em modificar importantes aspectos da inflamação pós-infarto miocárdico prevenindo assim, a disfunção cardíaca em ratos (Figura 17).

Figura 17. Resumo gráfico dos principais achados.



O dano tecidual causado por uma isquemia do miocárdio resulta na necrose de cardiomiócitos e consequente exposição de proteínas citoplasmáticas. Proteínas cardíacas são drenadas pelos linfonodos mediastinais, onde podem ser processadas e apresentadas para linfócitos T em um contexto inflamatório. Linfócitos T reativos a proteínas cardíacas podem promover reparo tecidual, mas também podem causar importantes danos colaterais. No presente trabalho, observamos que a administração oral de proteínas cardíacas, permite que a apresentação de antígenos relacionados ao coração ocorra num contexto não-inflamatório (tolerogênico) dos tecidos linfóides associados a mucosa (TLAM); e com isso, é capaz de polarizar a atividade imunológica numa direção que favorece uma melhor resolução da inflamação do miocárdio infartado.

O caminho até uma possível aplicação clínica desta abordagem inclui a solução de dois grandes problemas: Em primeiro lugar, é

preciso se elucidar uma mistura mínima de proteínas/peptídeos cardíacos que possam reproduzir (ao menos em boa parte) os efeitos do extrato cardíaco. Esta etapa deve incluir abordagens experimentais e desafios bastante semelhantes ao estudo de extratos fitoterápicos e desenvolvimento farmacêutico. Um segundo ponto importante, a ser considerado desde uma perspectiva clínica, é quanto a cinética de tratamento. Seria extremamente importante que se pudesse estabelecer um protocolo de tolerância que funcionasse como um pós tratamento. No entanto, a esmagadora maioria dos dados publicados até o momento apontam que a tolerância oral é melhor estabelecida profilaticamente (FARIA e WEINER, 2005), e excessões a este princípio são raras (NOVIELLO *et al.*, 2013). Esta é uma abordagem ainda incipiente mas potencialmente relevante. Assim, novos estudos serão necessários para se validar, melhor explicar e refinar a abordagem aqui apresentada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BESREDKA A. De l'anaphylaxie. Sixième memoire de l'anaphylaxie lactique. *Ann Ins. Pasteur*, 23: 166-174, 1909.

BET A. C. **Efeito de lipossomas de fosfatidilserina no processo inflamatório em modelo de bolha de ar em camundongos.** (Dissertação de Mestrado em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina). 56 p. 2008.

BEZNAK M. Hemodynamics during the acute phase of myocardial damage caused by isoproterenol. *Can J Biochem Physiol*, 40: 25-30, 1962.

BICCA M. A. **Papel do receptor B₂ para as cininas na neuroinflamação induzida pelo peptídeo beta-amilóide.** (Dissertação de Mestrado em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina). 126 p. 2012.

BROWN J. M., ANDERSON B. O., REPINE J. E., SHANLEY P. F., WHITE C. W., GROSSO M. A. Neutrophils contribute to TNF induced myocardial tolerance to ischaemia. *J Mol Cell Cardiol*. 24: 485-495. 1992.

BRYANT D., BECKER L., RICHARDSON J., SHELTON J., FRANCO F., PESHOCK R. Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation* 97: 1375-1381. 1998.

CAMPOS E. C. **Isoproterenol induz a perda primária de distrofina: correlação com a injúria miocárdica.** (Dissertação Mestrado em Patologia. Universidade de São Paulo). 74 p. 2008.

CAMPOS E. C., ROMANO M. M., PRADO C. M., ROSSI A. M. Isoproterenol induces primary loss of dystrophin in rat hearts: correlation with myocardial injury. *Int J Exp Pathol*, 89: 367-381, 2008.

- CARVALHO C. R., SOUZA A. V., VERDOLIN B. A., VAZ N.M. Indirect effects of oral tolerance in mice. *Scand J Immunol*, 39: 533-538, 1994.
- CARVALHO C. R., VAZ N. M. Indirect effects are independent of the way of tolerance induction. *Scand J Immunol*, 43: 613-618, 1996.
- CARVALHO C. R., VERDOLIN B. A., VAZ N. M. Indirect effects of oral tolerance cannot be ascribed to bystander suppression. *Scand J Immunol*, 45: 276-281, 1997.
- CASTRO-JUNIOR A. B., HORTA B. C., GOMES-SANTOS A. C., CUNHA A. P., SILVA-STEINBERG R., NASCIMENTO D. S., FARIA A. M. C., VAZ N. M. Oral tolerance correlates with high levels of lymphocyte activity. *Cell Immunol.* ,280: 171-181, 2012.
- CHAPPEL C. I., RONA G., BALAZS T., GAUDRY R. Severe myocardial necrosis produced by isoproterenol in the rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 122: 123-128, 1959.
- CHATTERJEE K., MASSIE B. Systolic and diastolic heart failure: differences and similarities. *J Card Fail.* 13: 569-576, 2007.
- CHATTERJEE K. Pathophysiology of systolic and diastolic heart failure. *Med Clin North Am.* 96:891-899, 2012.
- CHEN Z. M., PAN H. C., CHEN Y. P., PETO R., COLLINS R., JIANG L. X., XIE J. X., LIU L. S. Early intravenous then oral metoprolol in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 366:1622–1632. 2005.
- COSTA R. A., RUIZ-DE-SOUZA V., AZEVEDO Jr., GERALDO M., GAVA E., KITTEN G.T., VAZ N. M., CARVALHO C. R. Indirect effects of oral tolerance improve wound healing in skin. *Wound Repair and Regeneration.* v. 19, p. 487-497, 2011.
- COWIN A. J., BROSNAN M. P., HOLMES T. M., FERGUSON M. W. J. Endogenous inflammatory response to dermal wound healing in the fetal and adult mouse. *Dev. Dyn.* 212: 385-393, 1998.

CUNHA A. P., OLIVEIRA R. P., CASTRO-JUNIOR A. B., VAZ N. M., CARVALHO C. R. Different requirements for the adoptive transfer of oral tolerance and its indirect effects assessed by DTH and antibody responses in mice. *Cellular Immunology*, 258: 152–160, 2008.

CURATO C., SLAVIC S., DONG J., SKORSKA A., ALTARCHE-XIFRO W., MITEVA K., KASCHINA E., THIEL A., IMBODEN H., WANG J., STECKELINGS U., STEUNHOFF 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.* 185:6286-6293. 2010.

DE SOUZA, J. A. M. **Avaliação de dois métodos experimentais de indução de infarto agudo do miocárdio.** (Dissertação Mestrado em Clínica Cirúrgica. Pontifícia Universidade Católica do Paraná). 106 p. 2005.

DOBACZEWSKI M., XIA Y., BUJAK M., GONZALEZ-QUESADA C., FRANGOIANNIS N. G. CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. *Am J Pathol.* 176(5):2177 – 2187. 2010.

ELAHI M., ASOPA S., MATATA B. NO-cGMP and TNF-alpha counter regulatory system in blood: understanding the mechanisms leading to myocardial dysfunction and failure. *Biochim Biophys Acta.* 1772 (1): 5-14. 2007.

ERTL G., FRANTZ S. Healing after myocardial infarction. *Card Res*, 66: 22- 32, 2005.

FARIA A.M.C., FICKER S.M., SPEZIALI E., MENEZES J.S., STRANSKY B., VERDOLIN B. A., LAHMANN W. M., RODRIGUES V. S., VAZ N. M. Aging and immunoglobulin isotype patterns in oral tolerance. *Braz J Med Biol Res.* vol. 31 no. 1. 1998.

FARIA A. M., WEINER H. L. Oral tolerance. *Immunological Reviews.* 206:232- 259, 2005.

FOX K. A., CARRUTHERS K. F., DUNBAR D. R., GRAHAM C., MANNING J. R., DE RAEDT H., BUYSSCHAERT I.,

LAMBRECHTS D., VAN DE WERF F. Underestimated and underrecognized: the late consequences of acute coronary syndrome (GRACE UK–Belgian Study). *Eur Heart J.* 31:2755–2764. 2010.

FRACCAROLLO D., GALUPPO P., BAUERSACHS J. Novel therapeutic approaches to post-infarction remodelling. *Cardiovasc Res.* 94(2):293-303. 2012.

FRANGOIANNIS N. G. The immune system and cardiac repair. *Pharmacological Research.* 58: 88-111, 2008.

FRANTZ S., HOFMANN U., FRACCAROLLO D., SCHÄFER A., KANEPUHL S., HAGEDORN I, NIESWANDT B., NAHRENDORF M., WAGNER H., BAYER B., PACHEL C., SCHÖN M.P., KNEITZ S., BOBINGER T., WEIDEMANN F., ERTL G., BAUERSACHS J. Monocytes/macrophages prevent healing defects and left ventricular thrombus formation after myocardial infarction. *FASEB J.* 27(3):871-81, 2013.

FRANTZ S., BAUERSACHS J., ERTL G. Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc Res.* 81(3):474-81. 2009.

FRANTZ S., HOFMANN U. Role of Lymphocytes in Myocardial injury, healing and remodelling after myocardial infarction. *Circulation Research.* 116:134-67. 2015.

FRENKEL D., *et al.* Nasal vaccination with myelin oligodendrocyte glycoprotein reduces stroke size by inducing IL-10-producing CD4 + T cells. *J Immunol.* 171:6549–6555. 2003.

FRENKEL D., PACHORI A. S., ZHANG L., DEMBINSKY-VAKNIN A., FARFARA D., PETROVICSTOJKOVIC S., DZAU V. J., WEINER H. L. Nasal vaccination with troponin reduces troponin specific T-cell responses and improves heart function in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Int Immunol.*,21:817– 829, 2009.

GONNELLA P. A., NIDO P. J., MCGOWAN F. X. Oral tolerization with cardiac myosin peptide (614–629) ameliorates experimental autoimmune myocarditis: role of STAT 6 genes in BALB/CJ mice. *J Clin Immunol.* 29:434–443. 2009.

GONÇALVES R. P. M. **Função e reatividade cardíaca in situ na sepse em ratos: diferenças entre gêneros e modelos experimentais.** (Tese de Doutorado em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina). 174 p. 2014.

GOODCHILD T. T., ROBINSON K. A., PANG W., TONDATO F., CUI J., ARRINGTON J., GODWIN L., UNGS M., CARLESSO N., WEICH N., POZNANSKY M.C., CHRONOS N. A. Bone marrow-derived b cells preserve ventricular function after acute myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Interv.* 2:1005-1016. 2009.

GORDON J. W., SHAW J. A., LORRIE A. Multiple Facets of NF- κ B in the Heart To Be or Not to NF- κ B. *Circ Res.* 108:1122-1132, 2011.

GEHLBACH B. K., GEPPERT E. The pulmonary manifestations of left heart failure. *Chest.* 125:669, 2004.

GOODMAN L. S., GILMAN A. G., BRUNTON L. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 11. ed. Rio de Janeiro (RJ): McGraw Hill, 2006.

GRIMM D., ELSNER D., SCHUNKERT H., PFEIFER M., GRIESE D., BRUCKSCHLEGEL G., MUDERS F., RIEGGER G. A. J., KROMER E. P. Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res.* 37:91- 100. 1998.

GUYTON A. C., HALL J. E. *Textbook of medical physiology.* 12. ed. Pensilvânia: Elsevier. 2011.

HAREL-ADAR T, BEN MORDECHAI T, AMSALEM Y, FEINBERG MS, LEOR J, COHEN S. Modulation of cardiac macrophages by phosphatidylserine-presenting liposomes improves infarct repair. *Proc Natl Acad Sci.* 108:1827–1832. 2011.

HAYWOOD G. A., TSAO P. S., VON DER LEYEN H. E., MANN M. J., KEELING P. J., TRINDADE P. T., LEWIS N. P., BYRNE C. D., RICKENBACHER P. R., BISHOPRIC N. H., COOKE J. P., MCKENNA W. J., FOWLER M. B. Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure, *Circulation* 93,1087–1094. 1996.

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*, 125:1652-1663, 2012.

JENSEN J. A., KOSEK J. C., HUNT T. K., GOODSON W. H., MÜLLER D. C. Cardiac cryolesions as an experimental model of myocardial wound healing. *Ann. Surg.* 206 (6), 798-803, 1987.

KALRA D., BAUMGARTEN G., DIBBS Z., SETA Y., SIVASUBRAMANIAN N., MANN D. L. Nitric oxide provokes tumor necrosis factor- α expression in adult feline myocardium through a cGMP-dependent pathway. *Circulation*. 102, 1302–1307. 2000.

KANNEL, W. B. Risk stratification in hypertension: new insights from the Framingham Study. *Am J Hypertens*. 13 (Suppl 1): S3–S10. 2000.

KLONER R. A., FISHBEIN M. C., LEW H., MAROKO P. R., BRAUNWALD E. Mummification of the infarcted myocardium by high dose corticosteroids. *Circulation*. 57:56–64. 1978.

KONSTAM M. A. Systolic and diastolic dysfunction in heart failure? Time for a new paradigm. *J Cardiac Failure*. 9:1e3. 2003.

KÜHL H.P., HANRATH P. Chronic myocardial ischemia: indications and limits of dobutamine stress echocardiography. *Z Kardiol*. 87 Suppl 2:87-91, 1998.

LAROUMANIE F., DOUIN-ECHINARD V., POZZO J. *et al.* CD4⁺ T cells promote the transition from hypertrophy to heart failure during chronic PO. *Circulation*. 129:2111-24. 2014.

LI R. K., JIA Z. Q., WEISEL R. D., MICKLE D. A., ZHANG J., MOHABEER M. K., RAO V., IVANOV J. Cardiomyocyte transplantation improves heart function. *Ann. Thorac. Surg.* 62 (3): 654-60, 1996.

LIAO Y., CHENG X. Autoimmunity in myocardial infarction. *Int J Cardiol*, 112: 21-26, 2006.

MAENG M. System delay and timing of intervention in acute myocardial infarction (from the Danish Acute Myocardial Infarction-2 [DANAMI-2] trial). *Am J Cardiol.* 108: 776–781. 2011.

MAISEL A., CESARIO D., BAIRD S., REHMAN J., HAGHIGHI P., CARTER S. Experimental autoimmune myocarditis produced by adoptive transfer of splenocytes after myocardial infarction. *Circ Res*; 82: 458-463, 1998.

MANCIA G., BACKER G., DOMINICZAK A. *et al.* Guidelines for the management of arterial hypertension: The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* Jun; 28 (12): 1462-536. 2007.

MANCIA G., PARATI G., BORGHI C., GHIRONZI G., ANDRIANI E., MARINELLI L., VALENTINI M., TESSARI F., AMBROSIONI E. Hypertension prevalence, awareness, control and association with metabolic abnormalities in the San Marino population: the SMOOTH study. *J Hypertens.* 24: 837–843. OS. 2006.

MARON R., MELICAN N. S., WEINER H. L. Regulatory Th2-type T cell lines against insulin and GAD peptides derived from orally- and nasally-treated NOD mice suppress diabetes. *J Autoimmun.* 12:251–258. 1999.

MATZINGER, P. Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nat Immunol*, 8: 11-13, 2007.

MATZINGER P., KAMALA T. Tissue-based class control: the other side of tolerance. *Nat Rev Immunol* 11:221–230. 2011.

MCMURRAY J. J., ADAMOPOULOS S., ANKER S. D., AURICCHIO A., BÖHM M., DICKSTEIN K., FALK V., FILIPPATOS G., FONSECA C., GOMEZ-SANCHEZ M. A., JAARSMA T., KOBER L., LIP G. Y., MAGGIONI A. P., PARKHOMENKO A., PIESKE B. M., POPESCU B. A., RONNEVIK P. K., RUTTEN F. H., SCHWITTER J., SEFEROVIC P., STEPINSKA J., TRINDADE P. T., VOORS A. A., ZANNAD F., ZEHER A. ESC guidelines for

the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail.* 33 (8): 803-69, 2012.

McMURRAY J. J. Clinical practice. Systolic heart failure. *N Engl J Med.* 362: 228–238. 2010.

MERKLE S., FRANTZ S., SCHON M. P., BAUERSACHS J., BUITRAGO M., FROST R. J. A role for caspase-1 in heart failure. *Circ Res.* 100:645–653. 2007.

MILEI J., RAPAPORT M. Localization by autoradiography of tritiated isoproterenol in infarct- like lesions of rat myocardium. *Am Heart J.* 92:351-355. 1976.

MOHAN P., BLOOM S. Lipolysis is an important determinant of isoproterenol-induced myocardial necrosis. *Cardiovasc Pathol.* 8:255-261.1999.

MONNET E., CHACHQUES J. C. Animal modelo of heart failure: What is new? *Ann. Thorac. Surg.* 79: 1445-53, 2005.

MURRY C. E., SOONPAA M. H., REINECKE H., NAKAJIMA H., NAKAJIMA H. O., *et al.* Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428:664–68. 2004.

NAHRENDORF M., SWIRSKI F. K., AIKAWA E., STANGENBERG L., WURDINGER T., FIGUEIREDO J. L., LIBBY P., WEISSLEDER R., PITTET M. J. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med,* 204: 3037-3947, 2007.

NAIR AP, TIMOH T, FUSTER V.
Contemporary medical management of systolic heart failure. *Circ J.* 76(2):268-77. 2012.

NIELSEN P. H., TERKELSEN C. J., NIELSEN T. T., THUESEN L., KRUSELL L. R., THAYSEN P., KELBAEK H., ABILDGAARD U.,

VILLADSEN A. B., ANDERSEN H. R., OGAWA, Y., DURU E. A., AMEREDES B. T. Role of IL-10 in the resolution of airway inflammation. *Curr Mol Med.* 8(5):437-45. 2008.

NOVIELLO M. L., BATISTA N. V., DOURADO L. P., PEREIRA R. V., OLIVEIRA A. G., MENEZES G. B., CARA D. C. Prolonged ingestion of ovalbumin diet by Ova sensitized mice suppresses mBSA-induced arthritis. *Cell Immunol.* 284(1-2):20-8. 2013.

PABST O., MOWAT A. M. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunology*, 5: 232-239, 2012.

PACHER P., NAGAYAMA T., MUKHOPADHYAY P., BÁTSAI S., KASS D. A. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nature protocols*, v. 3, n. 9, p. 1422–34, jan. 2008.

PARISSIS J. T., ADAMOPOULOS S., VENETSANO K. F., MENTZIKOF D. G., KARAS S. M., KREMASTINOS D. T. Serum profiles of C-C chemokines in acute myocardial infarction: possible implication in post-infarction left ventricular remodeling. *J Interferon Cytokine Res.* 22(2):223–229. 2002.

PFEFFER M. A., PFEFFER J. M., FISHBEIN M. C., FLETCHER P. J., SPADARO J. KLONER R. A., BRAUNWALD E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ. Res.*; 44 (4): 503-512, 1979.

POLANCZYK C. A., RIBEIRO J. P. Coronary artery disease in Brazil: contemporary management and future perspectives. *Heart.* 95 (11):870-6, 2009.

PORTER K. E., TURNER N. A. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Therap.* 123: 255 – 278. 2009.

RAMOS G. C., FERNANDES D., CHARÃO C. T., SOUZA D. G., TEIXEIRA M. M., ASSREUY J. Apoptotic mimicry: phosphatidylserine liposomes reduce inflammation through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in vivo. *Br J Pharmacol.* 151(6):844-50. 2007.

RAMOS G. C., RODRIGUES C. M., AZEVEDO G. M., PINHO V., CARVALHO C. R., VAZ N. M. Cell- mediated immune responses to unrelated proteins and unspecific inflammation blocked by orally tolerated proteins. *Immunology*, 126:354-62, 2009.

RAMOS G. C. **Atividade imuno-inflamatória no reparo tecidual da lesão cardíaca induzida por isoproterenol em ratos: implicações e oportunidades terapêuticas.** (Tese de Doutorado em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina). 107 p. 2011.

RAMOS G. C., VAZ N. M., DAL BÓ S., LEITE D. P., GOLDFEDER E., ASSREUY J. Oral pretreatment with heart antigens modifies post-infarct immunological activity and improves cardiac repair in rats. *Autoimmunity*, 45:233-44, 2012.

REIS B. S., MUCIDA D. The role of intestinal context in the generation of tolerance and inflammation. *Clin Dev Immunol*, Epub 2012.

RONA G., CHAPPEL C. L., BALAZS T., GAUDRY R. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *Arch Pathol*. 67: 443-455, 1959.

RONA G., KAHN D. S., CHAPPEL C. I. Studies on infarct-like myocardial necrosis produced by isoproterenol: A review. *Rev. Can. Biol*. 22 (2): 241-55, 1963.

SCHWARTZ M., COHEN I. R. Autoimmunity can benefit self-maintenance. *Immunol Today*. 21:265-8, 2000.

SHAH A. M., MANN D. L. In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science. *Lancet*. 378:704-712. 2011.

SHIOURA K. M., GEENEN D. L., GOLDSPINK P. H. Assessment of cardiac function with the pressure-volume conductance system following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293(5):H2870-7. 2007.

STEG P. G., JAMES S. K., ATAR D., BADANO L. P., BLÖMSTROM-LUNDQVIST, C., BORGER M.A., DI MARIO, C., DICKSTEIN K., DUCROCQ G., FERNANDEZ-AVILES F., *et al.*

ESC Guidelines for the management of acute acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. Task force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 33 (20):2569-619, 2012.

SINGAL P. K., DHILLON K. S., BEAMISH R. E., DHALLA N. S. Protective effect of zinc against catecholamine-induced myocardial changes electrocardiographic and ultrastructural studies. *Lab Invest*. 44:426-433. 1981.

STRAMER B. M., MORI R., MARTIN P. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *J Invest Dermatol*. 127: 1009-1017. 2007.

TIBIRIÇÁ E. **Fisiopatologia em Medicina Cardiovascular**. 1. ed. Rio de Janeiro: Revinter. 2001.

THOMAS F., RUDNICH A., BACRI A. M., BEAN K., GUIZE L., BENETOS A. Cardiovascular mortality in hypertensive men according to presence of associated risk factors. *Hypertension*. 37:1256–1261. OS. 2001.

THYGESEN K., ALPERT J. S., JAFEE A. S., SIMOONS M. L., CHAITMAN B. R., WHITE H. D. Joint ESC/ACCF/AHA/WHF task force for the universal definition of myocardial infarction. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J*, 33 (20): 2551-67, 2012.

TODD C. W., TODD N. R., GUIMARAES A. C. Do Lymphocytes from chagasic patients respond to heart antigens? *Infection and immunity*, 40: 832-835, 1983.

TORRE-AMIONE G., ANKER S. D., BOURGE R. C., COLUCCI W. S., GREENBERG B. H., HILDEBRANDT P. Results of a non-specific immunomodulation therapy in chronic heart failure (ACCLAIM trial): a placebo-controlled randomised trial. *Lancet*; 371:228–236. 2008.

VAN DER LAAN A. M., NAHRENDORF M., PIEK J. J. Healing and adverse remodelling after acute myocardial infarction: role of the cellular immune response. *Heart*. 98 (18):1384-90. 2012.

VARDA-BLOOM N., LEOR J., OHAD D. G., HASIN Y., AMAR M., FIXLER R., BATTLER A., ELDAR M., HASIN D. Cytotoxic T lymphocytes are activated following myocardial infarction and can recognize and kill normal myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol*, 32:2141–9, 2000.

VAZ N. M., MAIA L. C. S., HANSON D. G., LYNCH J. M. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult mice by previous feeding with the specific antigen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 60: 110-115, 1977.

VERDOLIN B. A., FICKER S. M., FARIA A. M. C., VAZ N. M., CARVALHO C. R. Stabilization of serum antibody responses triggered by initial mucosal contact with the antigen independently of oral tolerance induction. *Braz J Med Biol Res*. 34: 211-219, 2001.

WEIRATHER J., HOFMANN U., BEYESDORF N., RAMOS G., VOGEL B., FREY A., ERTL G., KERKAU T., FRANTZ S. Foxp3⁺CD4⁺ T-cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. *Circ Res* 115, 55-67. 2014.

WELLS H. G. Studies on the chemistry of anaphylaxis. III. Experiments with isolated proteins, specially those of the hen's egg. *J Inf Dis*, 9: 147-171, 1911.

YAN X., SHICHITA T., KATSUMATA Y., MATSUHASHI T., ITO H., ITO K., ANZAI A., ENDO J., TAMURA Y., KIMURA K., FUJITA J., SHINMURA K., SHEN W., YOSHIMURA A., FUKUDA K., SANO M. Deleterious effect of the il-23/il-17a axis and gammadelta cells on left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Am Heart Assoc*. 1:e004408. 2012.

YU Q., WATSON R. R., MARCHALONIS J. J., LARSON D. F. A role for T lymphocytes in mediating cardiac diastolic function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 289:H643–H655. 2005.

ZANNAD F., ALLA F., DOUSSET B., PEREZ A., PITT B. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart

failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation*. 102:2700-6. 2000.

ZHANG B. J., LI L., BLOCK E. R., PATEL J. M., Nitric oxide-induced persistent inhibition and nitrosylation of active site cysteine residues of mitochondrial cytochrome-c oxidase in lung endothelial cells, *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* 288. C840–C849. 2005.

ZOUGGARI Y., AIT-OUFELLA H., BONNIN P., SIMON T., SAGE A. P., GUERIN C., VILAR J., CALIGIURI G., TSIANTOULAS D., LAURANS L., DUMEAU E., KOTTI S., BRUNEVALL P., CHARO I. F., BINDER C. J., DANCHIN N., TEDGUI A., TEDDER T. F., SILVESTRE J. S., MALLAT Z. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat Med*. 19:1273-1280. 2013.