

Efeito protetor do peptídeo mimético 4F da apolipoproteína AI na lesão Renal, cardíaca e na disfunção endotelial induzida pelo infarto agudo do miocárdio em ratos hipercolesterolêmicos que receberam contraste iodado

 <https://doi.org/10.56238/sevened2024.005-019>

Roberto de Souza Moreira

Professor Adjunto da UFCAT / Pós-doutorando da FMUSP

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7496-9178>

Maria Claudia Costa Irigoyen

Professora colaboradora do departamento de cardiopneumologia e professora orientadora dos PPG em Cardiologia e Fisiopatologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2097-3662>

José Manuel Condor Capcha

Não possui orcid

Post Doctoral Researcher University of Miami Coral Gables, United States

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/6031667171644406>

Talita Rojas Cunha Sanches

Biologista no Laboratório de Investigação Médica 12. Desde 2003 faço parte do grupo de pesquisa do LIM12 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7533-859X>

Paulo Sampaio Gutierrez

Médico-assistente (Anatomia Patológica) do Instituto do Coração do Hospital da Clínicas da F M U S P

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9544-2359>

Margoth Ramos Garnica

Biologista no Hospital da Clínica de São Paulo e na FMUSP

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3713-673X>

Irene de Lourdes Noronha

Professora Titular e Chefe do Serviço da Disciplina de Nefrologia Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina USP

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3208-4435>

Lúcia da Conceição Andrade

Professora Associada da Disciplina de Nefrologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da USP

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3078-8957>

RESUMO

Moreira, R.S, Irigoyen, M.C, Capcha, J.M.C, Sanches, T.R, Gutierrez, P.S, Garnica, M.R, Noronha, I.L, Andrade, L. Efeito protetor do peptídeo mimético 4F da apolipoproteína AI na lesão renal, cardíaca e na disfunção endotelial induzida pelo infarto agudo do miocárdio em ratos hipercolesterolêmicos que receberam contraste iodado.

INTRODUÇÃO: O uso de contraste após exame de angiografia nos animais infartados, induz a uma lesão renal aguda, sendo associado à piora do prognóstico e aumento da mortalidade. A hipercolesterolemia é um fator agravante da lesão do endotélio no infarto agudo do miocárdio (IAM) e o uso de contraste no diagnóstico e tratamento pode causar uma lesão renal aguda. O tratamento com a apolipoproteína AI de peptídeo mimético 4F, pode reverter a lesão do endotélio com redução da taxa de LDL e evitando sua oxidação. **OBJETIVOS:** Analisar o efeito da Apo A-I (utilizando o peptídeo mimético 4F) sobre a lesão cardíaca e renal induzida pelo infarto agudo do miocárdio (IAM) com uso de contraste em ratos hipercolesterolêmicos. **MÉTODOS:** Estudo prospectivo, com ratos em uso de dieta a 4 % de colesterol por 8 dias sendo dividido em grupo SHAM operado sem ligadura da coronária (n=6) ou animais infartados com ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda, com ou sem o uso de contraste e tratamento 6 horas após a indução do infarto: IAM (n=15), IAM+C (iopamidol 2,9 g/Kg de peso corpóreo injeção na artéria intrafemural n=15), IAM+4F (4F 10mg/kg de peso corpóreo injeção peritoneal n=8) e IAM+C+4F (n=8). Todos os resultados são analisados após 24 do IAM e expressos através de média e erro padrão. **RESULTADOS:** Observou-se que os grupos IAM+4F e IAM+C+4F apresentaram uma melhor resposta a lesão cardíaca e injúria renal em comparação com os grupos IAM e IAM+C. Houve uma melhora da função renal através do clearance de creatinina de 12h, aumento da expressão de eNOS, aumento do VEGF, preservação da morfologia mitocondrial, redução da inflamação com uma menor



expressão do CD68+(macrófagos), diminuição das células túnel positivas associado a um aumento da expressão de apolipoproteína AI (Apo AI) no tecido renal. O mesmo aconteceu na função cardíaca com diminuição da troponina plasmática, aumento da expressão de eNOS, VEGF, isolectina B4, redução da inflamação representado pela menor expressão de TLR4, células túnel positivas, melhora do perfil de colesterol, preservação da morfologia mitocondrial e associada ao aumento da expressão de Apo AI no tecido cardíaco. A hemodinâmica foi preservada com melhora do débito cardíaco, fração de ejeção, resposta barorreflexa, pressão diastólica final do ventrículo esquerdo e associado a diminuição da área de infarto medida tanto pelo ecocardiograma quanto pela imuno-histoquímica. Demonstramos que o tratamento com apolipoproteína AI pode ser uma opção terapêutica na lesão cardíaca e renal revertendo a resposta inflamatória através do efluxo de colesterol dependente da HDL.

Palavras-chave: Apolipoproteína, Hipercolesterolemia, Contraste, Infarto agudo do miocárdio/cirurgia, Lesão renal aguda, Nefropatia de contraste.



1 INTRODUÇÃO

1.1 MECANISMOS DA HIPERCOLESTEROLEMIA;

Os efeitos da hipercolesterolemia atuam na proliferação e diferenciação de células estaminais/progenitoras hematopoiéticas (CEPH). Além disso, a dislipidemia também atua em células vizinhas da CEPH e causam inflamação, arteriosclerose e doenças cardiovasculares. ^(1, 2, 3)

Hipercolesterolemia está associada às mudanças fenotípicas na função das células endoteliais que levam a um estado pró-inflamatório e pró-trombótico em diferentes segmentos da microcirculação. ^(4, 5)

A aterogênese acompanha três fases sendo uma disfunção endotelial, formação de placa de gordura e desenvolvimento da cápsula fibrosa. A hipótese mais discutida para sua etiologia é que a lesão inicial ocorre em resposta a uma alteração do endotélio causada por distúrbios no fluxo sanguíneo (shear stress), presença de lipídeos oxidados nas lipoproteínas ou presença de algum agente infeccioso. ⁽⁶⁾

1.2 EFEITOS DA ATEROSCLEROSE EM MODELO ANIMAL;

A esclerose sistêmica relacionada a alimentação rica em colesterol provoca uma doença auto-imune do tecido conjuntivo caracterizado pela função vascular diminuída, aumentando o estresse oxidativo, angiogênese prejudicada e a inflamação nos órgãos internos desenvolvendo o crosstalk principalmente relacionado a função renal. ^(7, 8)

Estudos utilizando um modelo de infarto em ratos hipercolesterolêmicos demonstraram um aumento do LDL em comparação com o HDL, imitando a situação encontrada em humanos. ⁽⁹⁾ Animais alimentados com uma dieta rica em colesterol apresentaram um agravamento do remodelamento ventricular em comparação com os animais que utilizaram uma dieta normal. Este estudo demonstra que a dieta hipercolesterolemica pode prejudicar a função cardíaca levando a uma diminuição do débito cardíaco efetivo e prejudicando outros órgãos. ^(9, 10)

O colesterol elevado em modelo de hipercolesterolemia com ratos, demonstrou um aumento da vulnerabilidade do miocárdio com piora da área de infarto, alteração significativa de número de células apoptóticas e associada com a ativação das vias de estresse do retículo endoplasmático. ^(11, 12)

1.3 AS ALTERAÇÕES DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO;

Na vigência de um infarto agudo do miocárdio ocorre um processo de isquemia do músculo do miocárdio que pode levar a necrose de parte da musculatura por falta de aporte adequado de oxigênio e nutrientes levando a apoptose das células cardíacas. ⁽¹³⁾

O infarto do miocárdio proporciona um dos principais agentes causadores da insuficiência cardíaca apresentando um alto índice de morbimortalidade, levando a um tratamento de alto custo nos

hospitais públicos e com o aumento da perspectiva de idade este custo tende a aumentar. Apesar dos avanços terapêuticos de tratamento, o prognóstico ainda é ruim podendo levar a morte em um período curto ou a doença de insuficiência cardíaca. Estudos com novas intervenções terapêuticas são fundamentais para o avanço no tratamento da doença.⁽¹⁴⁾

A escolha de um modelo de infarto agudo do miocárdio em animais que determine alterações fisiológicas encontradas em casos clínicos com humanos é de extrema importância para compreensão das doenças cardiovasculares. No mesmo modelo de IAM que utilizamos, foi confirmado desensibilização barorreflexa, redução da modulação parassimpática cardíaca e aumento da modulação simpática cardiovascular.⁽¹⁵⁾

O exame de ecocardiograma é um método confiável e comumente usados para examinar doenças cardiovasculares. Esta tecnologia moderna oferece uma nova oportunidade para estudar a disfunção cardíaca após o infarto agudo do miocárdio (IAM) em ratos. Parâmetros da função cardiovascular pode fornecer um prognóstico detalhado da fração de ejeção, débito cardíaco e principalmente área de infarto em animais.^(16, 17)

A troponina I (cTnI) tem um papel importante na avaliação de área isquêmica e prognóstico do paciente. Em modelo animal foi demonstrado o pico de alteração da troponina I 24 horas após a indução do infarto e a correlação da área de expansão do infarto com piora deste marcador em ratos. Sendo identificado como um ótimo marcador de lesão do miocárdio em ratos associado com o prognóstico de tratamento.^(18, 19)

No infarto, a ativação de leucócitos induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias que na fase aguda provocam alteração do sistema imune e propagação da resposta inflamatória sistêmica levando a disfunção intravascular e hemodinâmica.⁽²⁰⁾

Em um modelo de IAM em ratos com a ligadura da artéria coronária descendente anterior do ventrículo esquerdo, após vinte quatro horas os animais apresentaram uma diminuição importante da fração de ejeção associado com o aumento da área de infarto e reproduzindo o que ocorre com os humanos.⁽²¹⁾

O infarto agudo do miocárdio associado com a hipercolesterolemia em modelo animal, apresentou uma piora significativa no grupo sem tratamento com um aumento do LDL, triglicerídeos e diminuição do HDL no plasma. Uma redução significativa da expressão de e-NOS e VEGF, e aumento da área de infarto com apoptose no tecido cardíaco de ratos.⁽²²⁾

Somente a isquemia do miocárdio em modelo animal já leva a alteração significativa no tecido cardíaco demonstrando um aumento do TLR4 (Toll-like receptor 4) que é um importante indutor de apoptose demonstrado através das vias de P 38 MAPK, Bax, Bcl-2, cleaved caspase-3 e c-Jun/AP-1.⁽²³⁾

1.4 OS RISCOS DO USO DE CONTRASTE DE BAIXO PESO MOLECULAR

Apesar das medidas de proteção da função renal no exame de cateterismos ou angioplastia, o uso de contraste com baixo peso molecular no infarto agudo do miocárdio (IAM), está relacionado com uma piora da função renal em pacientes de alto risco que apresentam várias doenças de base associado a dislipidemia e está relacionada ao alto risco de mortalidade.⁽²⁴⁾

A nefrotoxicidade induzida por contraste (NIC) tem sido discutida como uma das causas de injúria renal aguda (IRA) no intra-hospitalar. Em pacientes com fatores de risco a incidência é bem maior, com aumento de 25% da creatinina basal em um período de 48 a 72 horas após o uso do contraste. A diminuição do ritmo de filtração glomerular (RFG) pode levar ao uso de terapias de hemodiálise que são invasivas e contribuem com a piora do prognóstico.⁽²⁵⁾

A insuficiência cardíaca com redução do volume arterial efetivo, podem levar a um maior risco de IRA no uso do contraste de baixo peso molecular, principalmente no uso de drogas vaso ativas que potencializa a ação de nefrotoxicidade.⁽²⁶⁾

Em estudo experimental com ratos hipercolesterolêmicos, os animais que receberam contraste de baixo peso molecular, apresentaram um agravamento da função renal em comparado com animais que não receberam.⁽²⁷⁾ Em modelo de nefrectomia do rim direito e isquemia com reperfusão renal em ratos, os animais hipercolesterolêmicos apresentaram uma diminuição do HDL associado a um aumento do LDL, e quando submetidos a isquemia renal apresentavam uma piora da função renal medida pelo clearance de inulina.⁽²⁸⁾

Trabalho utilizando um modelo de nefropatia induzida por contraste em ratos, administraram uma dose de 2,9 g/Kg de iopamidol e demonstraram uma piora da função renal medida pelo aumento de necrose tubular.⁽²⁹⁾ Em um modelo de lesão renal induzida pelo uso de contraste, os ratos apresentaram uma piora da função renal medida pelo clearance de creatinina, que foi mantida mesmo após seis dias do uso e está relacionada a apoptose das células tubulares no rim.⁽³⁰⁾

Em outro estudo de nefropatia induzida por contraste com o uso de uma dose de 2,9 g/Kg de iopamidol, os ratos apresentaram uma apoptose das células epiteliais nos tubulos renais pela ativação da via JnK (Jun N-terminal kinase) e P38 (mitogen-activated protein kinase), foi relacionado uso do contraste com o processo inflamatório, apoptose e injuria renal.^(30, 31)

1.5 CROSSTALK ENTRE CORAÇÃO E RIM NO USO DE CONTRASTE

O crosstalk é uma ativação cruzada entre uma lesão primária e disfunções aos outros órgãos. Em pacientes que apresentam baixo débito cardíaco houve aumento significativo da creatinina plasmática no exame de angiografia com uso de contraste.⁽³²⁾

A diminuição do fluxo efetivo de sangue da artéria renal e vasoconstrição são considerados principais mecanismos de lesão renal aguda. O uso de contraste somado ao baixo débito cardíaco após

sofrer um infarto agudo do miocárdio está associado a uma piora da função renal.^(32, 33)

Entretanto a hipercolesterolemia também está associada com a piora da função renal e estudos mostram que um aumento da creatinina durante o infarto agudo do miocárdio aumenta o risco de mortalidade em pacientes independente de outros fatores de risco convencionais. Sem considerar o uso de contraste que pode agravar mais o quadro do paciente em um momento de instabilidade hemodinâmica.⁽³⁴⁾

O aumento da creatina plasmática está associado com o aumento da área de infarto em pacientes que apresentaram infarto agudo do miocárdio.⁽³⁵⁾

A infarto agudo do miocárdio leva a uma doença crônica do coração causando a insuficiência cardíaca, a lesão renal aguda pode causar uma doença renal crônica a longo prazo e considerando este cenário a síndrome cardiorrenal e uma possibilidade de agravamento em pacientes com crosstalk.^(36, 37)

Pacientes que possuem fatores de risco aumentados, durante o procedimento invasivo com uso de contraste em exame diagnóstico ou de intervenção podem desenvolver lesão renal aguda quando não tratados adequadamente.⁽³⁸⁾

1.6 ESTUDO HEMODINÂMICO DE FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC), PRESSÃO ARTÉRIA (PA) E BARORRECEPTORES NO INFARTO DO MIOCÁRDIO

O controle hemodinâmico no infarto do miocárdio é importante para diminuir as complicações isquêmicas evitando a sobrecarga do miocárdio. A pressão arterial em níveis normais é fundamental para a manutenção da perfusão dos tecidos e órgãos.⁽³⁹⁾

A função barorreflexa prejudicada é um fator responsável pelo mau prognóstico em pacientes com infarto agudo do miocárdio. Em um momento de estresse cardíaco, a manutenção da homeostase cardiovascular é dependente da atuação dos pressorreceptores arteriais, receptores cardiopulmonares que diminuem o sofrimento cardiovascular.⁽⁴⁰⁾

Tanto o sistema simpático que controla os vasos e coração através de fibras eferentes, ou parassimpático utilizando o nervo vago até o coração. Estes comandos controlados pelos pressorreceptores aórticos e carotídeos são responsáveis pela manutenção eficiente do débito cardíaco e resistência periférica.⁽⁴¹⁾

Os pressorreceptores podem aumentar a atividade parassimpática, atuando na regulação da frequência cardíaca e da pressão arterial. A regulação do tônus vagal cardíaco é modulada pelos pressorreceptores, que é responsável pelo tônus vagal de repouso no animal quando acordado e utilizando a respiração voluntariamente e sempre lembrado que os quimiorreceptores e outros reflexos associados a respiração do animal pode alterar a atividade do sistema parassimpático.⁽⁴²⁾

As doenças cardiovasculares em um contexto geral, apresentam alterações da atividade

simpática que são mais conhecidas e estudadas. Mas existe um consenso sobre o sistema parassimpático, relacionando a função vagal preservada com a manutenção adequada da variabilidade da pressão arterial e uma melhor proteção dos órgãos-alvo.⁽⁴³⁾

A variabilidade da frequência cardíaca pode determinar o prognóstico de um paciente, quando está reduzida aumenta o risco de morte súbita durante o infarto agudo miocárdio.⁽⁴⁴⁾

1.7 LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE (HDL);

O controle dos níveis de HDL tem sido útil para avaliação do risco cardiovascular e estudos demonstraram a correlação entre a inflamação e a disfunção do HDL. Medidas funcionais dos níveis de HDL contribuem com informações importantes sobre a atividade da molécula e estão envolvidas na aterogênese, inflamação e infecção.^(45, 46)

A ação anti-aterosclerótica está associada à vários mecanismos de proteção da molécula de HDL, conforme demonstrado em estudo na população Europeia os níveis altos do HDL diminuem os riscos de doenças cardiovasculares mesmos nos pacientes diabéticos tipo 2.⁽⁴⁷⁾

O efluxo de colesterol celular, possui o papel importante no transporte reverso de colesterol (TRC), isto ocorre em mecanismos ativos ou de difusão passiva. Entre os processos ativos estão aqueles que envolvem a interação do HDL onde são geradas moléculas maduras de HDL₂ e HDL₃ a partir dos lipídios livres de apo AI ou lipídios pobres em pré-beta HDL. Estes precursores são produzidos como HDL nascente do fígado, intestino ou são liberados da molécula de VLDL lipolisado e quilomícrons.⁽⁴⁸⁾

O colesterol é ativamente bombeado para fora das células pelo transportador ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), mediada pelo efluxo de lipídio e a proteína de transferência de fosfolipídios (PLTP) na apo AI pobre em lipídios. A lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) que esterifica o colesterol no HDL, desempenha um papel importante no TRC porque os ésteres de colesterol são muito mais hidrofóbicos do que o colesterol e ficam presos nos núcleos das moléculas de

Uma parte do lipídeo livre de apo A-I é submetido a filtração glomerular nos rins.^(48, 49)

1.8 AÇÃO PROTETORA DAS LIPOPROTEÍNAS;

A lipoproteínas de alta densidade (HDL) está envolvida no efluxo de colesterol. O mecanismo de atuação do HDL ainda não é bem compreendido, devido à falta de informação sobre a estrutura da molécula. Em sua composição encontramos as apolipoproteínas que fazem parte da molécula de HDL e suas frações, e estão contidas nas partículas de lipoproteínas. Desempenham funções importantes no metabolismo lipoprotéico, como transporte dessas moléculas hidrofóbicas no meio aquoso plasmático, ligação aos receptores específicos na superfície celular, e ativação ou inibição de enzimas envolvidas

no metabolismo lipídico.^(50, 51)

A apolipoproteína A-I (apo A-I) é o maior componente da partícula de lipoproteína de alta densidade (HDL), contém cerca de 190-243 aminoácidos em sua composição, atua como cofator para a enzima lecitina colesterol acetiltransferase, e desempenha um papel fundamental na ligação de lipídeos e formação da molécula de HDL. Atua também como mediador na transferência do colesterol das células para as partículas de HDL e sua concentração plasmática de apo A-I é fortemente associada com HDL.⁽⁵²⁻⁵⁴⁾

1.9 O USO DO PEPTÍDEO MIMÉTICO 4F DA APOLIPOPROTEÍNA AI;

A busca de peptídeos menores que a apo A-I, mas com as mesmas propriedades lipídicas de ligação, levou a síntese de um peptídeo com 18 aminoácidos. Sua sequência (D-W-L-K-A-F-Y-D-K-V-A-E-K-L-K-E-A-F) não é idêntica a estrutura original da apo A-I, no entanto apresentam uma formação de α -hélices anfipáticas semelhantes aos encontrados na apo A-I e imita muitos dos lipídeos de propriedade obrigatória da apo A-I.⁽⁵⁵⁾

O 4F é o principal peptídeo mimético da Apo A-1. Tem demonstrado uma importante participação nos estados inflamatórios.⁽⁵⁶⁾

O peptídeo mimético da 4F (4F) apresenta 4 resíduos de fenilalanina fortemente hidrofóbica que permitiu uma maior penetração de moléculas de água para dentro do ambiente hidrofóbico. A penetração do peptídeo mimético da 4F ocorre através da fosfatidilcolina um fosfolípido presente nas membranas celulares e sendo demonstrado através de estudos *in vitro* que comprovaram a presença da 4F dentro das células.^(55, 57)

Concentrações plasmáticas de HDL diminuem com a idade em estudos prospectivos. Diminuição da concentração de HDL e sua função podem ocorrer secundárias a alterações hormonais, processos inflamatórios, e diabetes mellitus. Para além destes efeitos específicos o processo de envelhecimento pode estar envolvido com a diminuição da concentração de HDL e suas funções. A deficiência de HDL é extremamente rara entre os centenários. O HDL pode modular o processo de envelhecimento, não só pela sua bem conhecida função antiaterogênica, mas possivelmente também por interferir diretamente com o envelhecimento pela sinalização de proteínas como klotho. A maioria dos resultados atuais, no entanto, baseiam-se em cultura de células e em experiências com animais transgênicos. Não há estudos em modelos *in vivo*.⁽⁵⁸⁾

Os efeitos anti-inflamatórios e anti-aterogênicos do 4F são devido à elevação da formação do HDL, ao aumento do efluxo de colesterol e a redução da oxidação das lipoproteínas. Além disso, melhora da vaso-reatividade arterial é também uma importante função do 4F.⁽⁴⁶⁾ Atualmente, os níveis plasmáticos das apolipoproteínas A-I têm sido descritos como melhores preditores de doenças ateroscleróticas. A administração por via oral da apo A-I 4F inibe drasticamente a aterosclerose em

camundongos independentes das alterações dos níveis de HDL e colesterol total no plasma.⁽⁵⁹⁾

Um recente estudo mostrou que administrando apo A-I (4F) em camundongos houve elevação do HDL, redução de peróxidos lipídicos das lipoproteínas, aumento do efluxo de colesterol, diminuição de células inflamatórias, redução de níveis plasmáticos de LDL e ativação da via de paraoxonase favorecendo a conversão de moléculas pró-HDL com ação anti-inflamatória.⁽⁶⁰⁾

Estudo com o uso de apo A-I D-4F melhorou a cicatrização de lesões endoteliais de artérias carótídeas em camundongos no modelo de hipercolesterolemia. Apresentou uma diminuição significativa do estresse oxidativo e melhora da oxidação lipídica.⁽⁶¹⁾

A Apo A-I 4F protegeu contra a aterosclerose em modelo com animais. Os mecanismos incluem transporte reverso de colesterol, remoção de baixos níveis de lipídios oxidados e impedindo a oxidação do LDL. A administração intraperitoneal da apo A-I 4F reforçada a capacidade do HDL em proteger contra a oxidação do LDL em modelo de aterosclerose induzida por dieta em camundongos.⁽⁶²⁾

Não houve diferença na administração oral ou intraperitoneal, ambas apresentaram uma melhora significativa de lesão aterosclerótica em modelo de camundongos apo E- nulo com enxerto da veia cava inferior na carótida direita.⁽⁶³⁾

Em alguns estudos de revisão com o uso da apo A-I 4F, foi confirmada a atuação positiva do peptídeo sintético na prevenção e redução da aterosclerose em modelos animais. Seu efeito positivo foi demonstrado em ratos, camundongos, macacos e coelho.⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾

Mesmo em modelo de hipertrofia cardíaca em camundongos, com uso prolongado de dieta hipercolesterolêmica, a ação protetora da apo A-I 4F foi confirmada através da melhora da função cardíaca, aumento do HDL e diminuição do LDL.⁽⁶⁷⁾

Esta droga pode mostrar benefícios especialmente na síndrome coronariana aguda e exerce função protetora na síndrome da resposta inflamatória sistêmica.⁽⁶⁸⁾

Os estudos experimentais têm demonstrado benefícios comprovados na função cardiovascular, com aumento de moléculas antioxidantes, anti-inflamatórias, e aumento da paraoxonase e do eNOS.⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾

Recentemente demonstrei através de estudo realizado com ratos no modelo de sepse, a administração intraperitoneal de apo A-I 4F promoveu a formação de novas partículas de HDL. Este estudo demonstrou melhora do desempenho cardíaco, função renal e aumento da sobrevivência dos ratos.^(66, 72)

Estudos de farmacocinética e farmacodinâmica no uso oral da apo A-I 4F foi realizado, testando a segurança do peptídeo em humanos. Os resultados foram satisfatórios com aumento do HDL e melhora da sua atividade anti-inflamatória.⁽⁷³⁾

Algumas empresas farmacêuticas de grande importância no mercado mundial já estão testando o uso da apolipoproteína AI em humanos, ensaios clínicos de fase 1, 2 e 3 já estão em andamento,

demonstram a importância do uso deste peptídeo em tratamentos futuros.⁽⁷⁴⁾

Atualmente, o estudo do peptídeo 4F já se encontra em fase pré clínica para tratamento de doença coronariana e aterosclerose.⁽⁷⁵⁾

Os efeitos benéficos do HDL na aterosclerose têm sido atribuídos a apo A-I. Esta pode ser utilizada como intervenção terapêutica. Entretanto como é uma proteína muito grande, é muito difícil ser produzida e é também extremamente cara. Devido a este problema, atualmente, tem sido produzido peptídeos miméticos da Apo A-I que podem ser utilizados na terapêutica da aterosclerose com sucesso terapêutico de redução na placa de ateroma e melhora da vascularização do miocárdio.^(74, 76)

A apolipoproteína A-I foi investigada em estudo randomizado, duplo cego, multicêntrico, sendo avaliado a segurança farmacocinética e farmacodinâmica na infusão em pacientes com doença aterosclerótica estável. Os resultados evidenciaram uma segurança global favorável, sem a presença de toxicidade hepática, renal e com aumento da concentração de apo A-I no plasma melhorando o efluxo de colesterol.⁽⁷⁷⁾

Em estudo recente foi demonstrado que o uso do inibidor da bromodomain and extraterminal domain (BET), aumenta a produção de transcrição do gene da Apo A-I em humanos, apresentou uma elevação do número de moléculas de HDL associado a apo A-I com ação efetiva na melhora das vias pró-inflamatórias, pró-ateroscleróticas e pró-trombóticas que podem contribuir para o risco de Doença Cardiovascular.⁽⁷⁸⁾

1.10 HIPÓTESE

A partir das evidências científicas analisadas, trabalhamos com a hipótese que os ratos hipercolesterolêmicos, infartados e com uso de contraste pudessem apresentar manifestações cardíacas e renais semelhantes às observadas nos pacientes internados. Vale destacar que o tratamento prévio das lesões cardíacas e renais são fundamentais para o prognóstico dos pacientes.⁽⁷⁹⁾

2 OBJETIVO

O objetivo fundamental deste projeto foi analisar o efeito da Apo A-I (utilizando o peptídeo mimético 4F) sobre a lesão cardíaca e renal induzida pelo infarto agudo do miocárdio (IAM) com uso de contraste em ratos hipercolesterolêmicos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Interpretar parâmetros estruturais e funcionais cardíacos através de ecocardiografia transtorácica em ratos wistar com 8 semanas de idade, animais hipercolesterolêmicos infartados, assim como os animais hipercolesterolêmicos infartados utilizando contraste com e sem tratamento de apo AI 4F e comparando-os aos controles.

- Identificar alterações morfológicas das mitocôndrias do coração e rim em ratos wistar com 8 semanas de idade, animais hipercolesterolêmicos infartados, assim como os animais hipercolesterolêmicos infartados com uso de contraste com e sem tratamento de apo AI 4F e comparando-os aos controles.
- Verificar se a expressão da apo AI 4F está aumentada em coração e rim de ratos wistar com 8 semanas de idade, animais sham, hipercolesterolêmicos infartados, assim como os animais hipercolesterolêmicos infartados com uso de contraste e comparando-os aos animais tratados com apo AI 4F.
- Fornecer dados sobre o distúrbio do metabolismo lipídico nos ratos wistar com 8 semanas de idade, animais hipercolesterolêmicos infartados, assim como os animais hipercolesterolêmicos infartados com uso de contraste com e sem tratamento de apo AI 4F e comparando-os aos controles.
- Investigar a resposta inflamatória e os mecanismos de angiogênese envolvidos no sistema vascular do coração e rim de ratos wistar com 8 semanas de idade, animais hipercolesterolêmicos infartados, assim como os animais hipercolesterolêmicos infartados com uso de contraste com e sem tratamento de apo AI 4F e comparando-os aos controles.
- Realizar o controle da pressão diastólica final de ventrículo esquerdo (PDFVE), resposta vasomotora, barorreflexa em ratos wistar com 8 semanas de idade, animais hipercolesterolêmicos infartados, assim como os animais hipercolesterolêmicos infartados com uso de contraste com e sem tratamento de apo AI 4F e comparando-os aos controles.

3 MATERIAIS E MÉTODO

Os procedimentos experimentais foram desenvolvidos em concordância com o guia institucional de cuidados e uso de laboratório, com aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais (FMUSP – CAPPESQ) Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil/ Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (#261/13).

O modelo animal utilizado em nosso projeto consiste em uma linhagem de Ratos Wistar machos com pesos entre 200 – 250g e cerca de 8 semanas de vida foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os animais foram mantidos separados, em ambiente com temperatura (22 – 24°C) e luz controladas (ciclo de 12 horas claro/escuro). Tiveram livre acesso a água e a dieta hipercolesterolêmica foi preparada de acordo com a dieta padrão para roedores AIN-93G e modificada pela substituição de 3,5% do óleo de soja, por gordura hidrogenada e adição de 4% de colesterol e 0,4% de ácido cólico.⁽⁸⁰⁾

Os animais foram randomicamente divididos em cinco grupos a seguir relacionados.

Nós utilizamos o modelo de IAM (infarto agudo do miocárdio) descrito por Pfeffer et al, 1979.⁽⁸¹⁾

3.1 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL;

Em todos os animais receberam dieta de colesterol à 4% e foram separados em 5 grupos:

3.1.1). Sham (**S**);

3.1.2). Infartado (**I**);

3.1.3). Infartado com contraste (**IC**);

3.1.4). Infartado tratado com APO AI 4F (**I+4F**);

3.1.5). Infartado com contraste tratado com APO AI 4F (**IC+4F**).

Os grupos experimentais acima mencionados foram estudados após cinco períodos distintos: 8º dia, 0h do 9º dia, 6h do 9º dia, 12h do 9º dia e 10º dia. É importante ressaltar que, os animais infartados, foram incluídos no protocolo somente quando foi confirmada área de acinesia (por ecocardiografia) e exame de troponina 24 horas após o procedimento cirúrgico para induzir o infarto. Também cabe ressaltar que foram considerados para o estudo aqueles com o mínimo de 15% de área de acinesia nas 24 horas.

A seguir, serão apresentados procedimentos comuns a todos os estudos feitos. Cabe ressaltar que esta sequência metodológica apresentada será mantida na apresentação dos resultados e na sua discussão.

3.1.1 Grupo Sham 8 dias de dieta colesterol 4% (SHAM);

0h: Pesagem, canulação artéria e veia femural.

6h: O volume do veículo com SF 0,9% foi administrado por via intravenosa (iv), utilizando uma artéria femural, para cada animal e foram equivalentes ao volume de contraste e volume do veículo com SF 0,9% foi administrado por via intraperitoneal (ip), para cada animal e foram equivalentes ao volume da Apo AI 4F.

12h: Início do controle de diurese por 12h em gaiola metabólica.

24h: Registro de pressão arterial, frequência cardíaca (30 min), avaliação da sensibilidade barorreflexa, avaliação ecocardiográfica e medida da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo e eutanásia para retirada do plasma para análise bioquímica e tecido para análise de biologia molecular.

3.1.2 Grupo 8 dias de dieta colesterol 4% Infartado (IAM);

0h: Pesagem, canulação artéria e veia e IAM

6h: O volume do veículo com SF 0,9% foi administrado por via intravenosa (iv), utilizando uma artéria femural, para cada animal e foram equivalentes ao volume de contraste e volume do veículo

com SF 0,9% foi administrado por via intraperitoneal (ip), para cada animal e foram equivalentes ao volume da Apo AI 4F.

12h: Início do controle de diurese por 12h em gaiola metabólica.

24h: Registro de pressão arterial, frequência cardíaca (30 min), avaliação da sensibilidade barorreflexa, avaliação ecocardiográfica e medida da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo e eutanásia para retirada do plasma para análise bioquímica e tecido para análise de biologia molecular.

3.1.3 Grupo 8 dias de dieta colesterol 4% Infartado com Contraste (IAM+C);

0h: Pesagem, canulação artéria e veia e IAM

6h: Injeção de contraste iopamidol 2.9 g iodine/kg de peso corpóreo na artéria femoral e volume do veículo com SF 0,9% foi administrado por via ip, para cada animal, e foram equivalentes ao volume da Apo AI 4F.

12h: Início do controle de diurese por 12h em gaiola metabólica.

24h: Registro de pressão arterial, frequência cardíaca (30 min), avaliação da sensibilidade barorreflexa, avaliação ecocardiográfica e medida da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo e eutanásia para retirada do plasma para análise bioquímica e tecido para análise de biologia molecular.

3.1.4 Grupo 8 dias de dieta colesterol 4% Infartado Tratado com APO AI 4F (IAM+4F);

0h: Pesagem, canulação artéria e veia e IAM

6h: O volume do veículo com SF 0,9% foi administrado por via iv, utilizando uma artéria femoral, para cada animal e foram equivalentes ao volume de contraste. Receberam o tratamento com APO AI IP/10mg/kg.

12h: Início do controle de diurese por 12h em gaiola metabólica.

24h: Registro de pressão arterial, frequência cardíaca (30 min), avaliação da sensibilidade barorreflexa, avaliação ecocardiográfica e medida da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo e eutanásia para retirada do plasma para análise bioquímica e tecido para análise de biologia molecular.

3.1.5 Grupo 8 dias de dieta colesterol 4% Infartado com Contraste Tratado com APO AI 4F (IAM+C+4F);

0h: Pesagem, canulação artéria e veia e IAM

6h: Injeção de contraste iopamidol 2.9 g iodine/kg de peso corpóreo na artéria femoral e tratamento com APO AI IP/10mg/kg.

12h: Início do controle de diurese por 12h em gaiola metabólica.

24h: Registro de pressão arterial, frequência cardíaca (30 min), avaliação da sensibilidade barorreflexa, avaliação ecocardiográfica e medida da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo e eutanásia para retirada do plasma para análise bioquímica e tecido para análise de biologia molecular.

3.2 INDUÇÃO DO INFARTO

Os animais foram pesados e anestesiados com uma mistura de Ketamina (50 mg/ Kg) e Xilazina (12 mg/Kg) por via intraperitoneal, colocados em decúbito dorsal e entubados (gelco-14G). Um pequeno corte foi realizado na pele, e os músculos peitorais afastados. O animal foi submetido à respiração artificial (Intermed, Inter 3, São Paulo, SP) e foi realizada uma toracotomia esquerda no quarto espaço intercostal, sendo colocado um afastador entre as costelas para a melhor visualização.

O pericárdio foi aberto e o átrio esquerdo afastado para visualização da veia interventricular anterior como referência à artéria. O procedimento para a ligadura da artéria interventricular anterior consistiu na passagem de um fio sob a veia atingindo parte da musculatura, onde se encontra a artéria. Esta foi ligada (fio mononylon 6,0) provocando a isquemia do tecido adjacente.

Após a ligadura da coronária, a toracotomia foi fechada (fio mononylon 4,0) e o pneumotórax retirado. Os músculos afastados foram reposicionados e a pele foi suturada (fio mononylon 4,0). Logo após a recuperação do animal e o início de reflexos suprimidos pela ação dos anestésicos, o animal foi retirado da ventilação artificial e estimulada a respiração, em ambiente aquecido, para recuperação. Foi administrado por via intramuscular de 30000 UI benzilpenicilina²⁴. (Figura 1).

3.3 MEDIDAS HEMODINÂMICAS

3.3.1 Mensurações da pressão arterial e frequência cardíaca em ratos com 24 horas após indução do procedimento cirúrgico (IAM);

A análise dos sinais de pressão foi realizada utilizando-se um programa comercial associado ao sistema de aquisição. Este programa permitiu a detecção de máximos e mínimos da curva de pressão batimento a batimento, fornecendo os valores de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) pela integral da área sob a curva no tempo. A frequência cardíaca (FC) foi determinada a partir do intervalo entre dois picos sistólicos. Os resultados foram apresentados em valores médios e desvios padrões dos períodos em que os dados foram analisados para PA e FC. As planilhas de dados obtidas foram analisadas em programa comercial para análise (Excel 5.0), onde se calcularam a média e desvio padrão da PAM, PAS, PAD e FC para cada animal. A variabilidade da PAM foi calculada, utilizando-se a média dos desvios padrões de cada animal estudado. O coeficiente da variabilidade da pressão arterial média foi conseguido por meio da razão da variabilidade da PAM pelo valor da pressão arterial média da cada animal em estudo.²⁵

3.4 AVALIAÇÃO DO REFLEXO PRESSORRECEPTOR;

Após o registro de PAM e os animais terem permanecido em condições de repouso por 15 minutos, a sensibilidade dos pressorreceptores foi testada através da infusão de fenilefrina e logo após, nitroprussiato de sódio. A fenilefrina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), um potente estimulador α_1 , cuja ação predominante se dá nas arteríolas periféricas causando vasoconstrição foi injetada em doses crescentes na cânula da veia femoral. Tal fármaco foi utilizado, portanto, para causar aumento da pressão arterial, efeito que provoca bradicardia reflexa subsequente, comandada pelos pressorreceptores.

Efeito contrário, qual seja, redução da pressão arterial com resposta taquicardia, também comandada pelos pressorreceptores, foi provocado pela injeção doses crescente de nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), um potente vasodilatador tanto de arteríolas como de veias, cuja ação se dá por meio da ativação da guanilato ciclase e aumento da síntese de 3', 5' (minutos)- guanosina monofosfato (GMP cíclico) na musculatura lisa dos vasos e outros tecidos.

Para avaliação da sensibilidade dos pressorreceptores, o pico máximo ou mínimo da PAM foi reduzido dos valores de PAM do período controle. Da mesma forma, a variação máxima da frequência cardíaca foi reduzida dos valores de frequência cardíaca do período controle, imediatamente antes da infusão das drogas, para posterior quantificação das respostas. A sensibilidade barorreflexa foi avaliada pelo índice calculado através divisão da variação da FC pela variação da PAM.²⁵

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão expressos em média \pm erro padrão ou média \pm desvio padrão. Diferenças entre as médias dos múltiplos parâmetros foram analisadas pelo método One-Way ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. O programa estatístico utilizado foi o GraphPrism 5.0. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

5.1 DADOS BIOQUÍMICOS

A tabela 1 abaixo apresenta os dados bioquímicos. Como podemos observar houve melhora significativa da creatinina sérica nos animais IAM e IAM + C tratados com 4F em relação aos animais com IAM e IAM+C não tratados. O tratamento com 4F reverteu completamente esta alteração.

Podemos observar também na tabela 1 elevação dos níveis séricos de enzimas hepáticas nos animais infartados com contraste, demonstrando haver disfunção hepática, apresentando recuperação significativa da alteração com o tratamento do peptídeo 4F. Da mesma forma, houve aumento significativo do lactato sérico no grupo IAM + C. O tratamento com 4F normalizou os valores de lactato. Importante observar os níveis de Triglicérides, Colesterol Total, VLDL, LDL e HDL nos

animais com infartados. Há significante elevação dos triglicérides, colesterol total, VLDL e LDL, e diminuição do HDL neste modelo de IAM com contraste. O tratamento com 4F reverteu significativamente todas as alterações principalmente na diminuição do LDL e aumento do HDL.

Tabela 1. Dados bioquímicos em animais com 24 horas de IAM ou SHAM.

	SHAM	IAM	IAM+C	IAM+4F	IAM+C+4F
Creatinina (mg/dl)	0,27±0,02	0,57±0,04 ^{a,b,c}	0,65±0,04 ^{a,b,c}	0,38±0,02 ^c	0,39±0,02 ^g
Volume urinário (ml/12h)	0,02±0,002	0,006±0,001 ^{e,f}	0,009±0,002 ^{f,k}	0,02±0,005	0,03±0,004
Frações de excreção de sódio (FENa %)	0,127±0,09	0,196±0,09	0,299±0,07	0,176±0,08	0,245±0,07
Fração de excreção de potássio (FEK%)	14,9±1,88	19,6±8,44	27,0±7,96	22,2±8,07	22,8±8,35
Osmolalidade urinária (mOsm/kg)	860,1±84,6	1019,0±220,8	674,9±178,1	806,8±314,2	836,0±341,8
Lactato (mmol/l)	1,54±0,12	2,4±0,11 ^{j,k,l}	2,66±0,2 ^{g,h,l}	1,74±0,2	1,87±0,2
Triglicerídeos (Mg/dl)	39,8±8,5	114,1±14,6 ^{d,e,f}	120,0±13,6 ^{d,e,l}	43,9±11,6	62,58±13,6
Colesterol total (Mg/dl)	95,7±7,5	145,0±10,5 ^{j,k,l}	154,8±9,42 ^{g,h,i}	93,8±11,4	100,9±14,0
VLDL (Mg/dl)	7,1±0,8	23,7±0,95 ^{a,b,c}	25,3±1,2 ^{a,b,c}	8,62±2,1	11,1±2,8
LDL (Mg/dl)	35,5±4,2	118,5±4,8 ^{a,b,c}	120,9±5,4 ^{a,b,c}	42,7±7,3 ^j	62,2±5,2 ^j
HDL (Mg/dl)	44,0±4,3	57,5±10,7	42,3±9,9 ^{h,i}	77,8±3,9 ^g	72,6±4,1 ^g

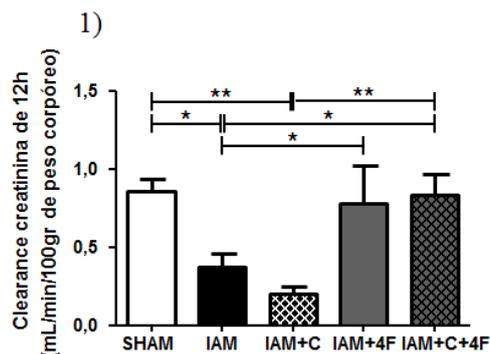
^a p < 0,0001 vs. Sham; ^b p < 0,0001 vs. IAM+4F; ^c p < 0,0001 vs. IAM+C+4F; ^d p < 0,001 vs. Sham; ^e p < 0,001 vs. IAM+4F; ^f p < 0,001 vs. IAM+C+ 4F; ^g p < 0,01 vs. Sham; ^h p < 0,01 vs. IAM+4F; ⁱ p < 0,01 vs. IAM+C+4F; ^j p < 0,05 vs. Sham; ^k p < 0,05 vs. IAM+4F; ^l p < 0,05 vs. IAM+C+ 4F. Dados expressos em média ±EPM.

5.2 MEDIDAS DE FUNÇÃO RENAL ATRAVÉS DO CLEARANCE DE CREATININA DE 12H;

Como observado na figura 1 e tabela 2 demonstramos que após 24 horas da indução do infarto, há uma redução significativa do clearance de creatinina de 12h nos grupos tratados com 4F.

O tratamento com 4F restabeleceu a função renal semelhante ao grupo Sham.

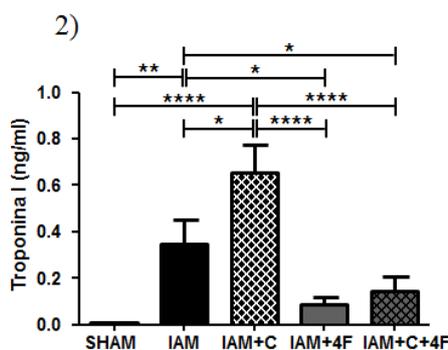
Figura 1. Clearance de creatinina 12 horas após a indução do IAM e IAM+C. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (n=8 animais por grupo).



5.3 MEDIDAS DE FUNÇÃO CARDÍACA E ATRAVÉS DO EXAME PLASMÁTICO DE TROPONINA I;

Como podemos observar na figura 2A e tabela 3, há um aumento do marcador de área isquêmica no grupo IAM e IAM+C. Os grupos IAM+4F e IAM+C+4F apresentaram uma redução significativa dos valores troponina I. A especificidade do exame de troponina I foi confirmada no grupo SHAM.

Figura 2. Exame plasmático de troponina I 24 horas após a indução do IAM.

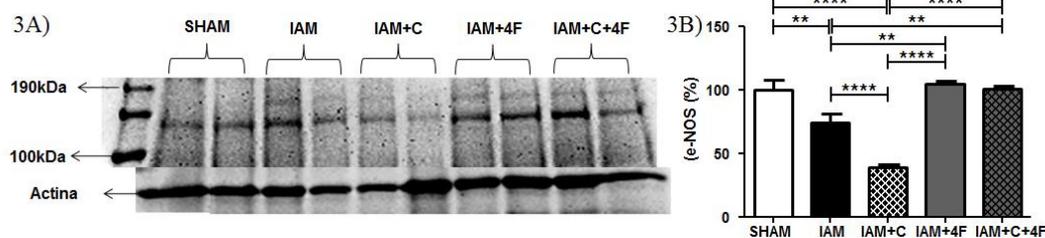


5.4 ESTUDO DE WESTERN BLOTTING PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS NO TECIDO RENAL

5.4.1 Estudo da expressão de eNOS;

Como podemos observar na (Fig. 3A e 3B) e tabela 4, há diminuição significativa da expressão da proteína eNOS. A expressão desta proteína nos animais infartados (grupos IAM e IAM+C) encontra-se significativamente menor. Assim como o grupo SHAM o tratamento com o peptídeo restaurou a expressão da eNOS nos grupos IAM+4F e IAM+C+4F no tecido renal.

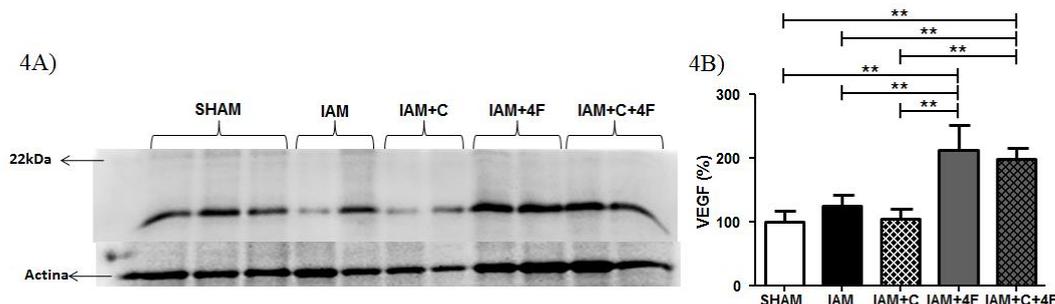
Figura 3A e 3B. Expressão da proteína eNOS em tecido renal. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (n=8 animais por grupo).



5.4.2 Estudo da expressão de VEGF;

Como podemos observar na (Fig. 4A e 4B) e tabela 5, há diminuição significativa da expressão da proteína VEGF. A expressão desta proteína nos animais infartados (grupos IAM e IAM+C) encontra-se significativamente menor, assim como o grupo SHAM que não recebeu estímulo por isquemia. O tratamento com o peptídeo restaurou a expressão do VEGF nos grupos IAM+4F e IAM+C+4F no tecido renal.

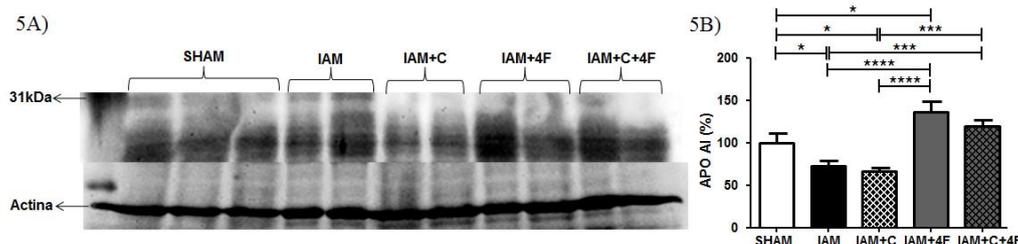
Figura 4A e 4B. Expressão da proteína VEGF em tecido renal. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (n=8 animais por grupo).



5.4.3 Estudo da expressão de APO AI;

Como podemos observar na (Fig. 5A e 5B) e tabela 6, há diminuição significativa da expressão da proteína APO AI. A expressão desta proteína nos animais infartados (grupos IAM e IAM+C) encontra-se significativamente menor, assim como o grupo SHAM que não recebeu tratamento. O tratamento com o peptídeo restaurou a expressão da APO AI nos grupos IAM+4F e IAM+C+4F no tecido renal.

Figura 5A e 5B. Expressão da proteína APO AI em tecido renal. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (n=8 animais por grupo).

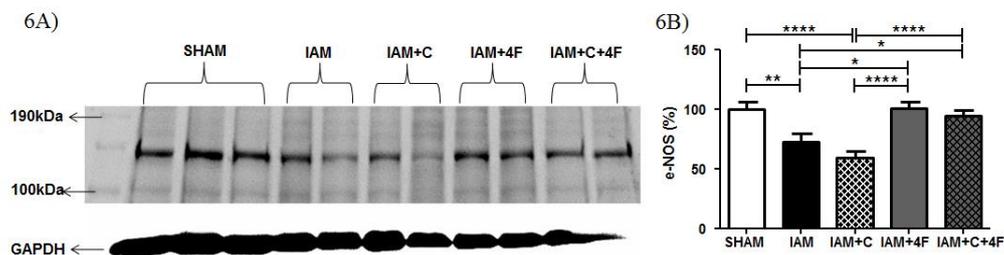


5.5 ESTUDO DE WESTERN BLOTTING PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS NO TECIDO CARDÍACO;

5.5.1 Estudo da expressão de eNOS;

Como podemos observar na (Fig. 6A e 6B) e tabela 7, há diminuição significativa da expressão da proteína eNOS. A expressão desta proteína nos animais infartados (grupos IAM e IAM+C) encontra-se significativamente menor. Assim como o grupo SHAM o tratamento com o peptídeo restaurou a expressão da eNOS nos grupos IAM+4F e IAM+C+4F no tecido cardíaco.

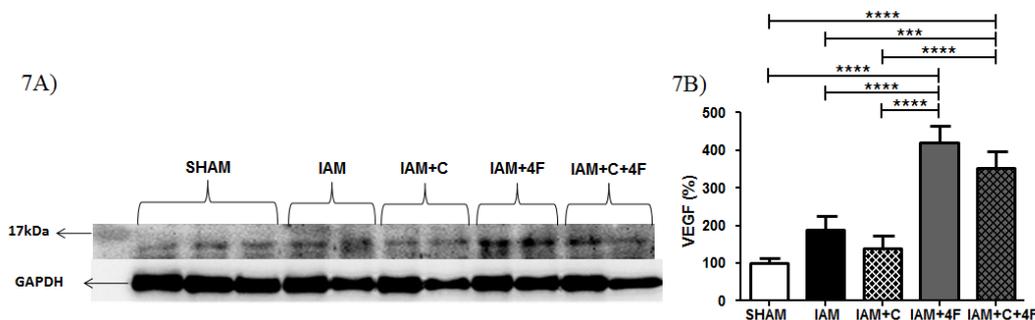
Figura 6A e 6B. Expressão da proteína eNOS em tecido cardíaco. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (n=8 animais por grupo).



5.5.2 Estudo da expressão de VEGF;

Como podemos observar na (Fig. 7A e 7B) e tabela 8, há diminuição significativa da expressão da proteína VEGF. A expressão desta proteína nos animais infartados (grupos IAM e IAM+C) encontra-se significativamente menor, assim como o grupo SHAM que não recebeu estímulo por isquemia. O tratamento com o peptídeo restaurou a expressão do VEGF nos grupos IAM+4F e IAM+C+4F no tecido cardíaco.

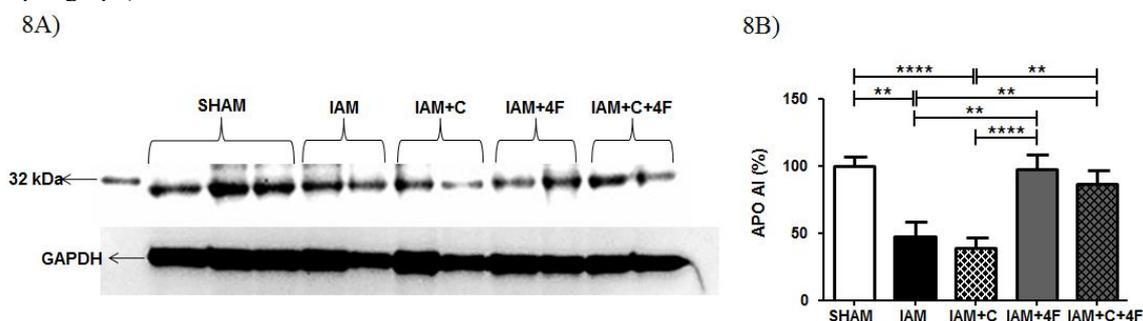
Figura 7A e 7B. Expressão da proteína VEGF em tecido cardíaco. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (n=8 animais por grupo).



5.5.3 Estudo da expressão de APO AI;

Como podemos observar na (Fig. 8A e 8B) e tabela 9, há diminuição significativa da expressão da proteína APO AI. A expressão desta proteína nos animais infartados (grupos IAM e IAM+C) encontra-se significativamente menor, assim como o grupo SHAM que não recebeu tratamento. O tratamento com o peptídeo restaurou a expressão da APO AI nos grupos IAM+4F e IAM+C+4F no tecido cardíaco.

Figura 8A e 8B. Expressão da proteína APO AI em tecido cardíaco. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (n=8 animais por grupo).

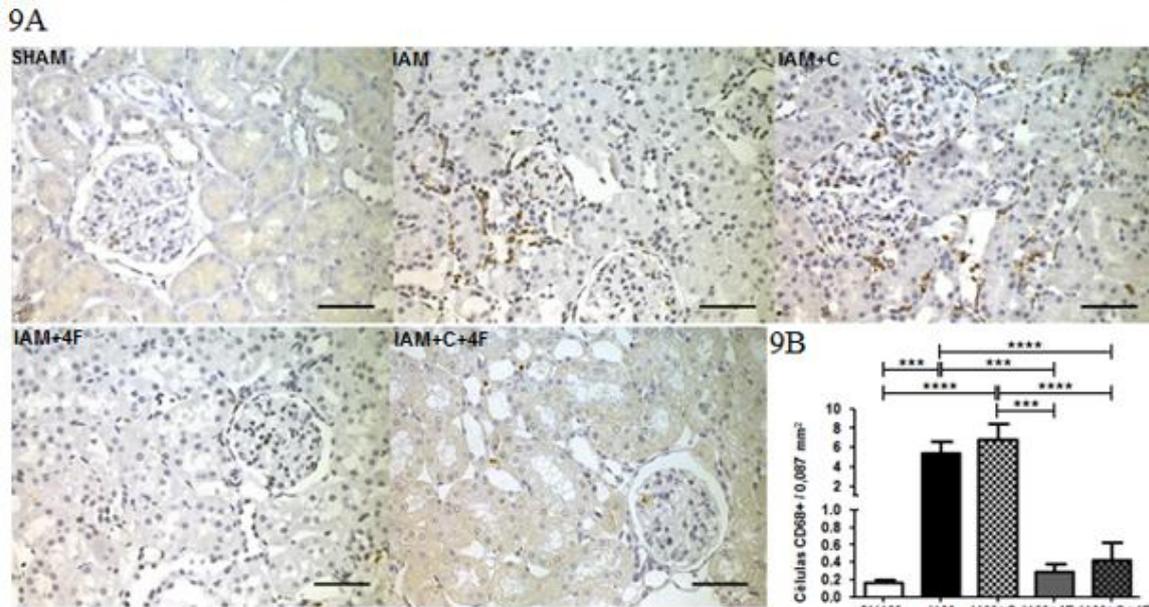


5.6 ESTUDO DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA A DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTÉICA DAS CÉLULAS E MORFOLOGIA MITOCONDRIAL NO INFARTO DO MIOCÁRDIO NO TECIDO RENAL;

5.6.1 Estudo da expressão protéica das células positivas de CD 68 no tecido renal;

Podemos observar um aumento de macrófagos nos grupos IAM e IAM+C na (Fig. 9A, 9B e tabela 10) apresentou um escore com coloração positiva mais expressivo e houve uma melhora significativa nos grupos IAM+4F e IAM+C+4F representado na (Fig. 9A, 9B e tabela 10) *em comparação ao grupo SHAM*.

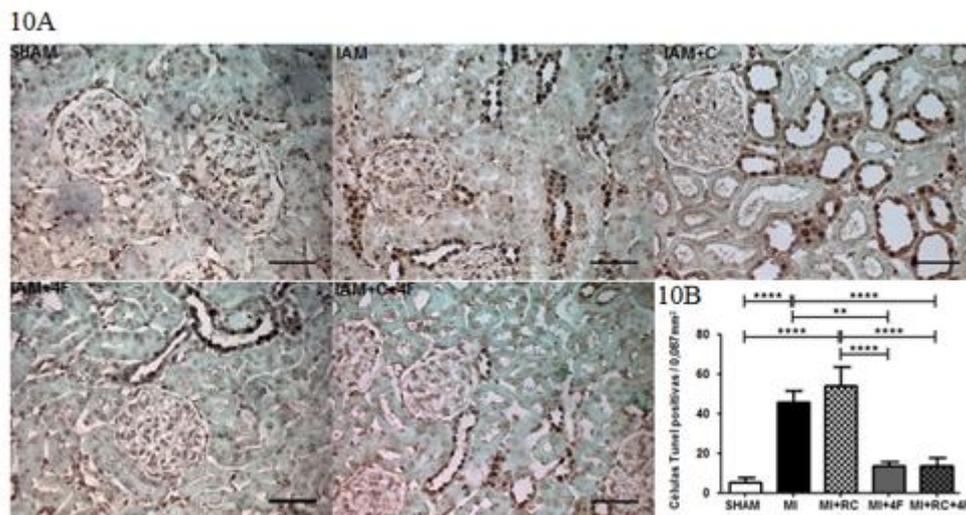
Figura 9A e 9B. Imunohistoquímica da expressão do CD 68 no tecido renal. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (n=6 animais por grupo).



5.6.2 Estudo da expressão protéica das células TUNEL positivas no tecido renal;

Podemos observar um aumento de célula apoptóticas nos grupos IAM e IAM+C na (Fig. 10A, 10B e tabela 11) apresentou um escore com coloração positiva mais expressivo e houve uma melhora significativa nos grupos IAM+4F e IAM+C+ 4F representado na (Fig. 10A, 10B e tabela 11) *em comparação ao grupo SHAM*.

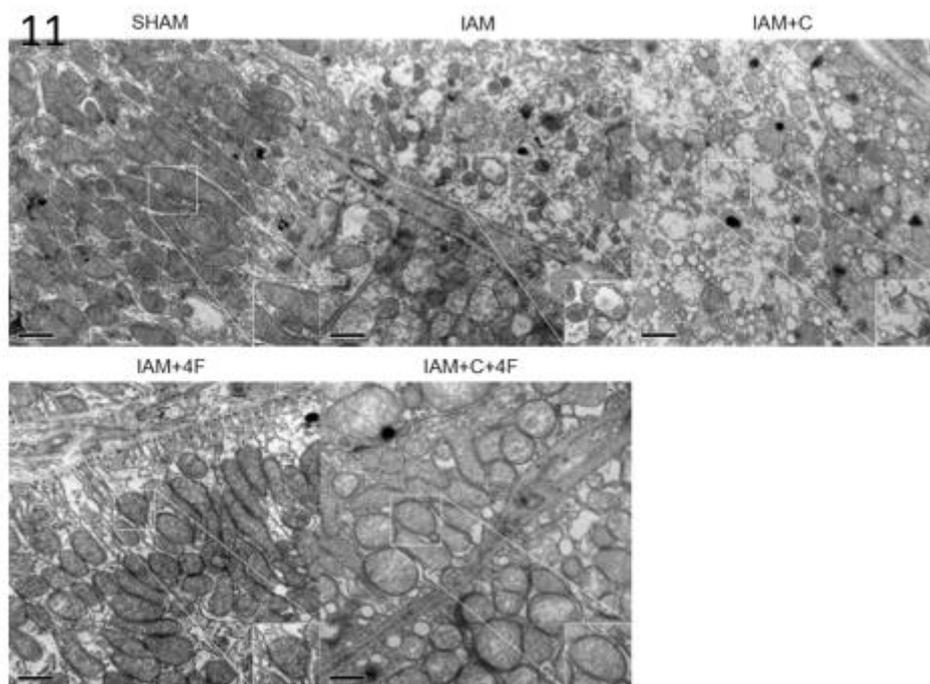
Figura 10A e 10B. Imunohistoquímica da expressão das células TUNEL positivas no tecido renal. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (n=6 animais por grupo).



5.6.3 Estudo da morfologia mitocondrial no infarto do miocárdio no tecido renal;

Podemos observar alterações morfológicas nas cristas das mitocôndrias com formações de balões dentro da sua estrutura nos grupos IAM e IAM+C na (Fig. 11) apresentou uma alteração visível na imagem. Podemos associar as mesmas alterações encontradas nas mitocôndrias do coração e com o tratamento houve uma melhora das alterações nos grupos IAM+4F e IAM+C+4F que ficaram com aspectos morfológicos mais semelhante ao grupo SHAM representado na (Fig. 11).

Figura 11. Morfologia mitocondrial no infarto do miocárdio no tecido renal.

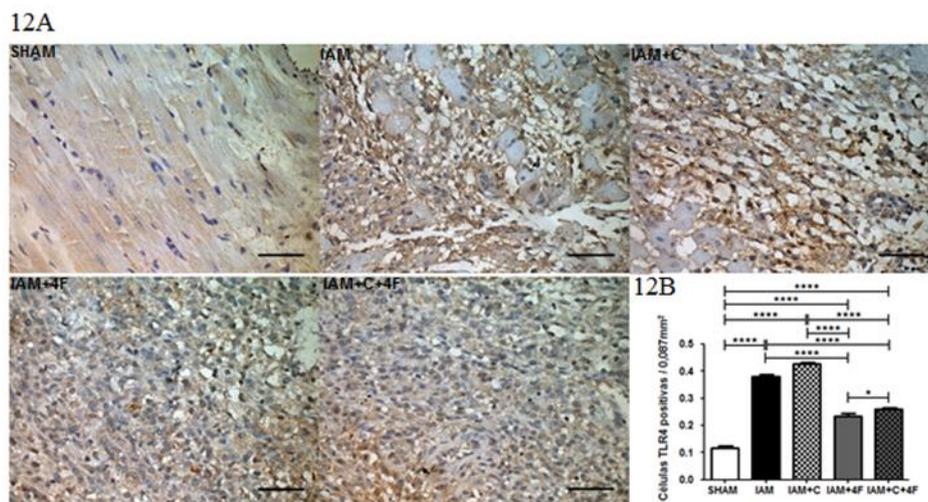


5.7 ESTUDO DE IMUNOHISTOQUÍMICA PARA A DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTÉICA DAS CÉLULAS E MORFOLOGIA MITOCONDRIAL NO INFARTO DO MIOCÁRDIO NO TECIDO CARDÍACO;

5.7.1 Estudo da expressão protéica das células TLR4 positivas no tecido cardíaco;

Podemos observar um aumento de célula TLR4 positivas nos grupos IAM e IAM+C na (Fig. 12A, 12B e tabela 12) apresentou um escore com coloração positiva mais expressivo e houve uma melhora significativa nos grupos IAM+4F e IAM+C+ 4F representado na (Fig. 12A, 12B e tabela 12) *em comparação ao grupo SHAM.*

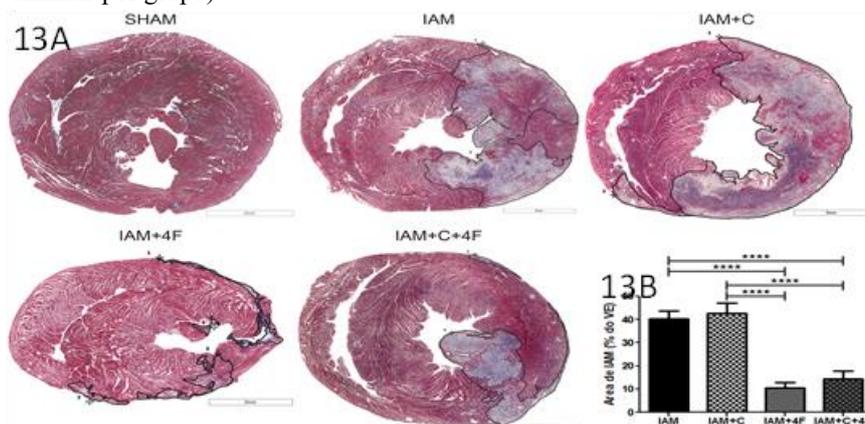
Figura 12A e 12B. Imunohistoquímica da expressão das células TLR4 positivas no tecido cardíaco. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (n=6 animais por grupo).



5.7.2 Estudo da expressão de área de infarto no tecido cardíaco;

Podemos notar na (Fig. 13A, 13B e tabela 13), imagens de cortes transversais dos corações dos grupos estudados, na altura dos músculos papilares, avaliada pela razão entre o volume da área marcada com o corante de Masson e o volume total do coração. A porcentagem da área de infarto está aumentada nos grupos IAM e IAM+C, sendo que os animais tratados com a 4F (IAM+4F e IAM+C+4F), apresentaram uma melhora significativa na área de infarto.

Figura 13A e 13B. Imunohistoquímica da expressão da área de IAM no tecido cardíaco. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (n=6 animais por grupo).

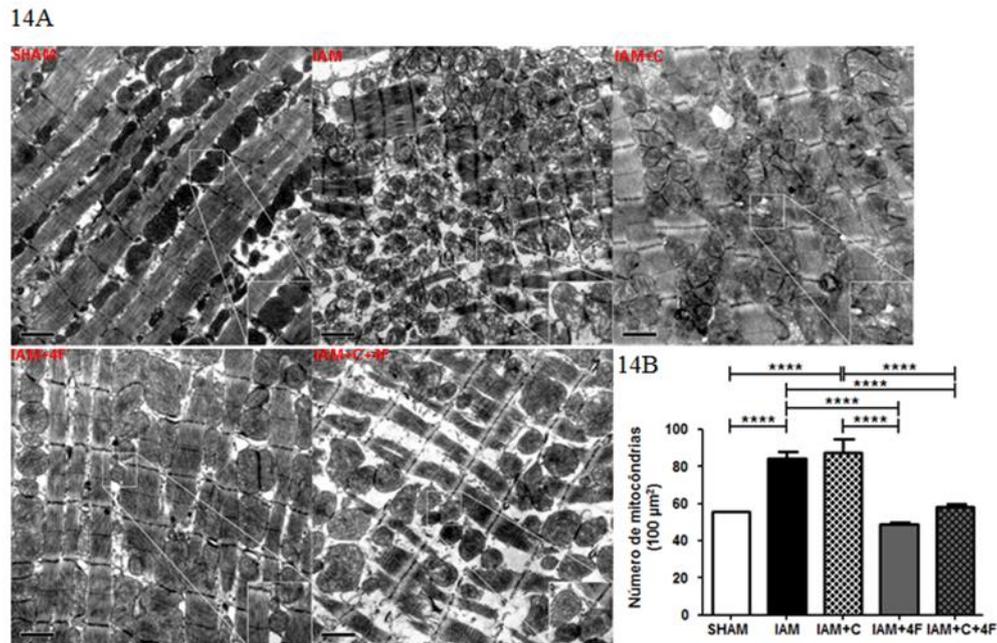


5.7.3 Estudo da morfologia e quantificação mitocondrial no infarto do miocárdio em região de ventrículo esquerdo em corações de ratos;

Como podemos observar na (Fig. 14A, 14B e tabela 14) ocorreu um aumento no número de mitocôndrias identificado pela técnica de microscopia eletrônica, nos animais infartados dos grupos IAM e IAM+C. Houve uma melhora significativa nos grupos IAM+4F e IAM+C+ 4F representado na (Fig. 14A, 14B e tabela 14) em comparação ao grupo SHAM. O resultado encontrado no nosso modelo

de disfunção cardíaca corrobora o quadro apresentado até agora e reforça a premissa de que modificações na estrutura mitocondrial estão associadas a um aumento de mitocôndrias na área infartada e comprometendo o bom funcionamento da bomba cardíaca.

Figura 14A e 14B. Número de mitocôndrias (100 μm^2 área mitocondrial). * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (n=6 animais por grupo).

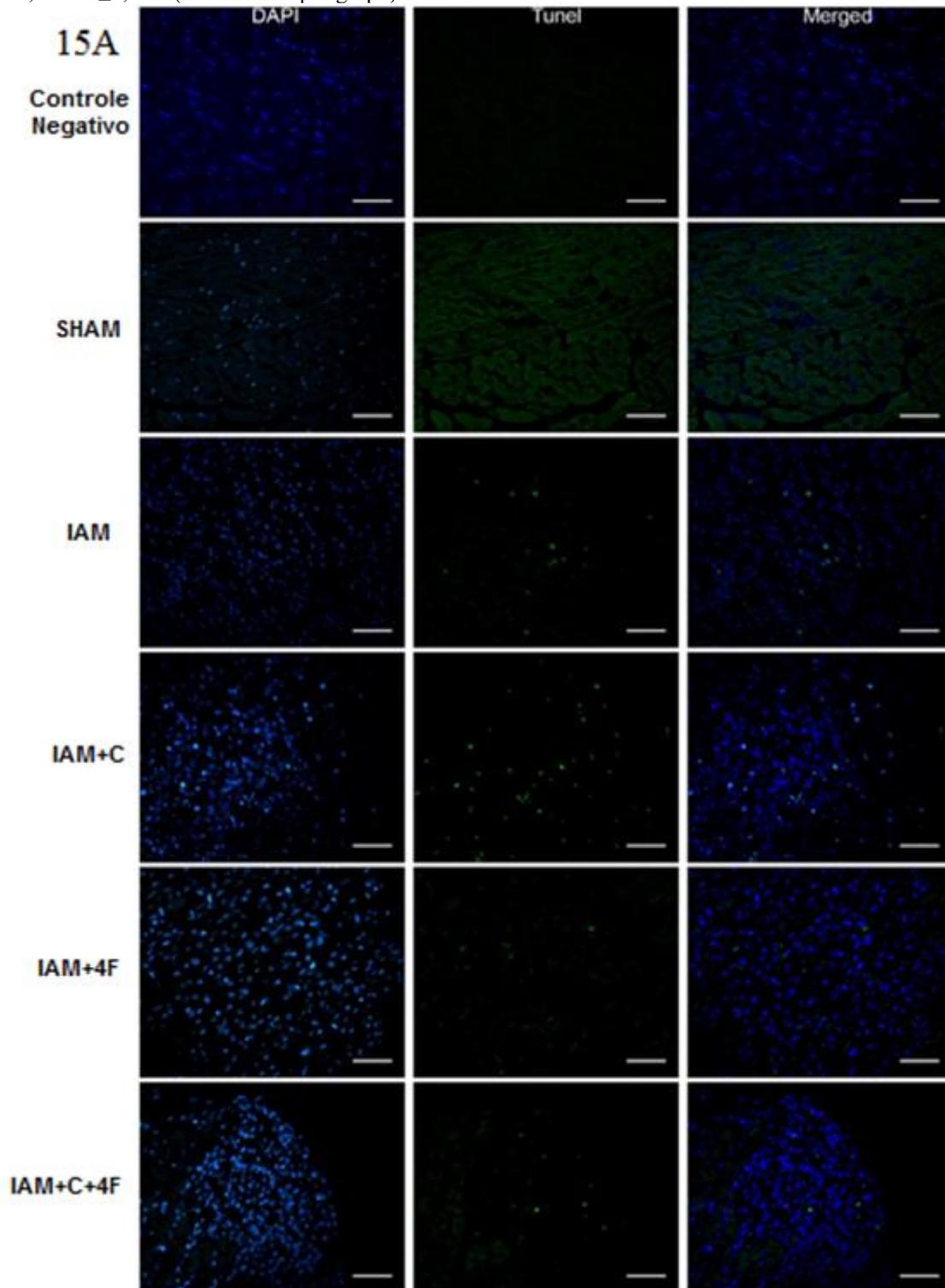


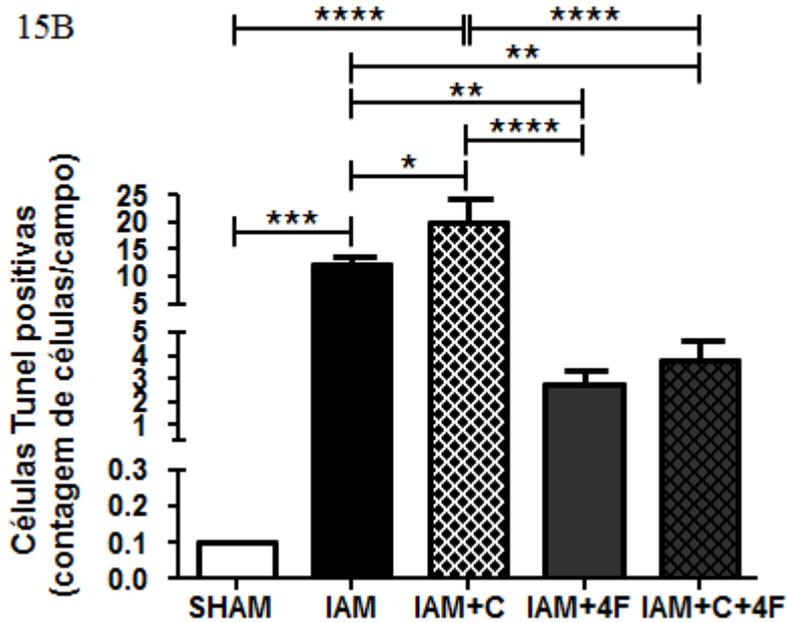
5.8 ESTUDO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA A DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTÉICA DAS CÉLULAS NO TECIDO CARDÍACO

5.8.1 Estudo da expressão protéica das células TUNEL positivas no tecido cardíaco;

Podemos observar um aumento de célula apoptóticas nos grupos IAM e IAM+C na (Fig. 15A, 15B e tabela 15) apresentou um escore com coloração positiva mais expressivo e houve uma melhora significativa nos grupos IAM+4F e IAM+C+ 4F representado na (Fig. 15A, 15B e tabela 15) *em comparação ao grupo SHAM*.

Figura 15A e 15B. Imunohistoquímica da expressão das células Tuncel positivas no tecido cardíaco. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (n=8 animais por grupo).

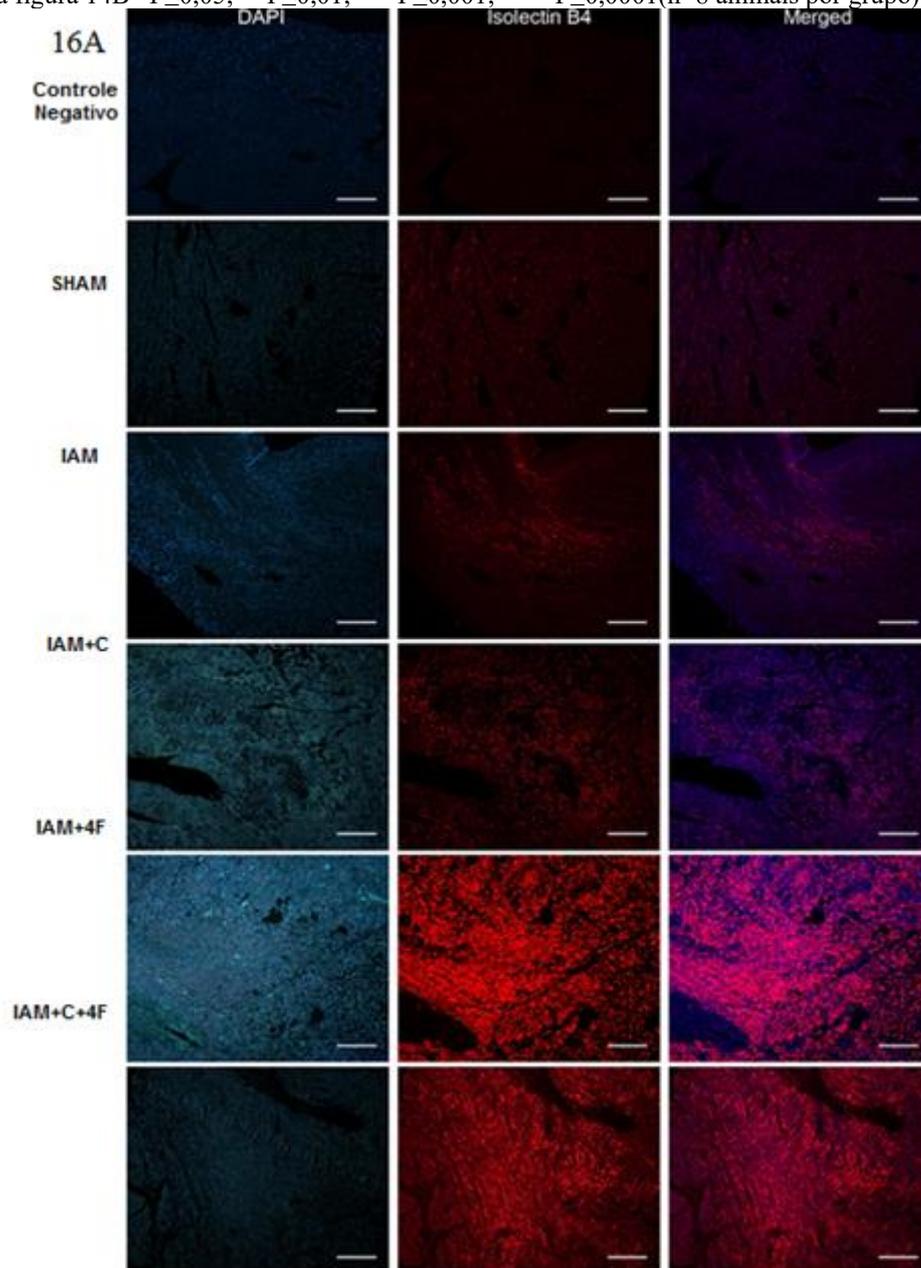


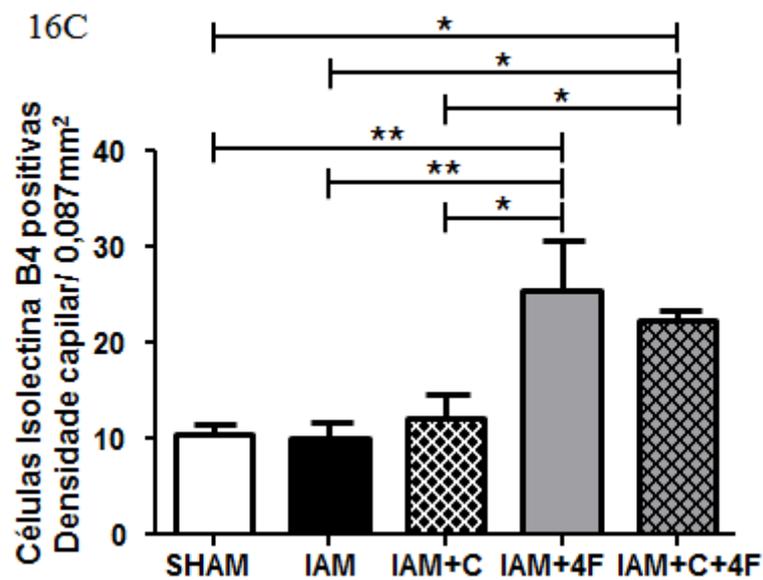
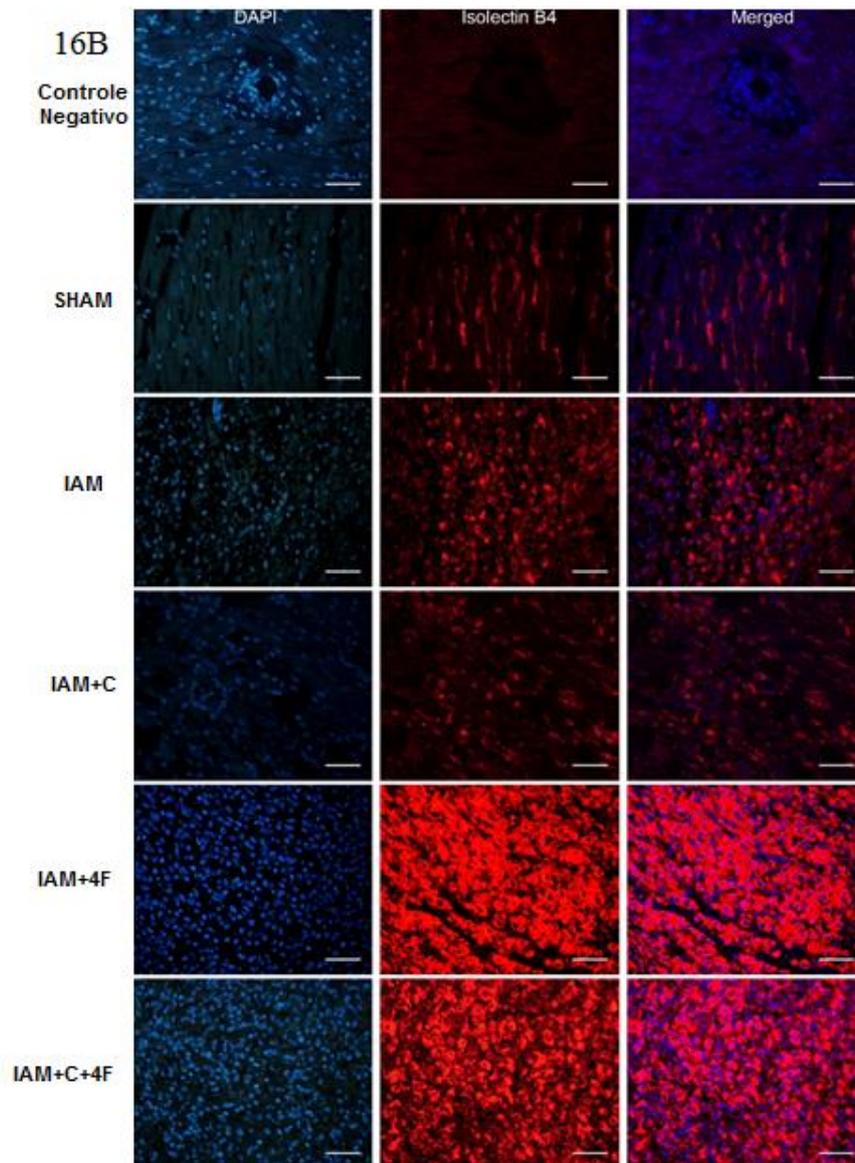


5.8.2 Estudo da expressão protéica das células com isolectina B4 positivas no tecido cardíaco;

Podemos observar uma diminuição da angiogênese nos grupos IAM e IAM+C na (Fig. 16A, 16B, 16C e tabela 16) apresentou uma diminuição da expressão da microvascularização capilar, representativa através do escore com coloração diminuída e houve uma melhora significativa nos grupos IAM+4F e IAM+C+ 4F representado na (Fig. 16A, 16B,16C e tabela 16) *em comparação ao grupo SHAM.*

Figura 16A, 16B e 16C. Imunohistoquímica da expressão das células Isolectina B4 positivas no tecido cardíaco. Valores representativos da figura 14B * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (n=8 animais por grupo).





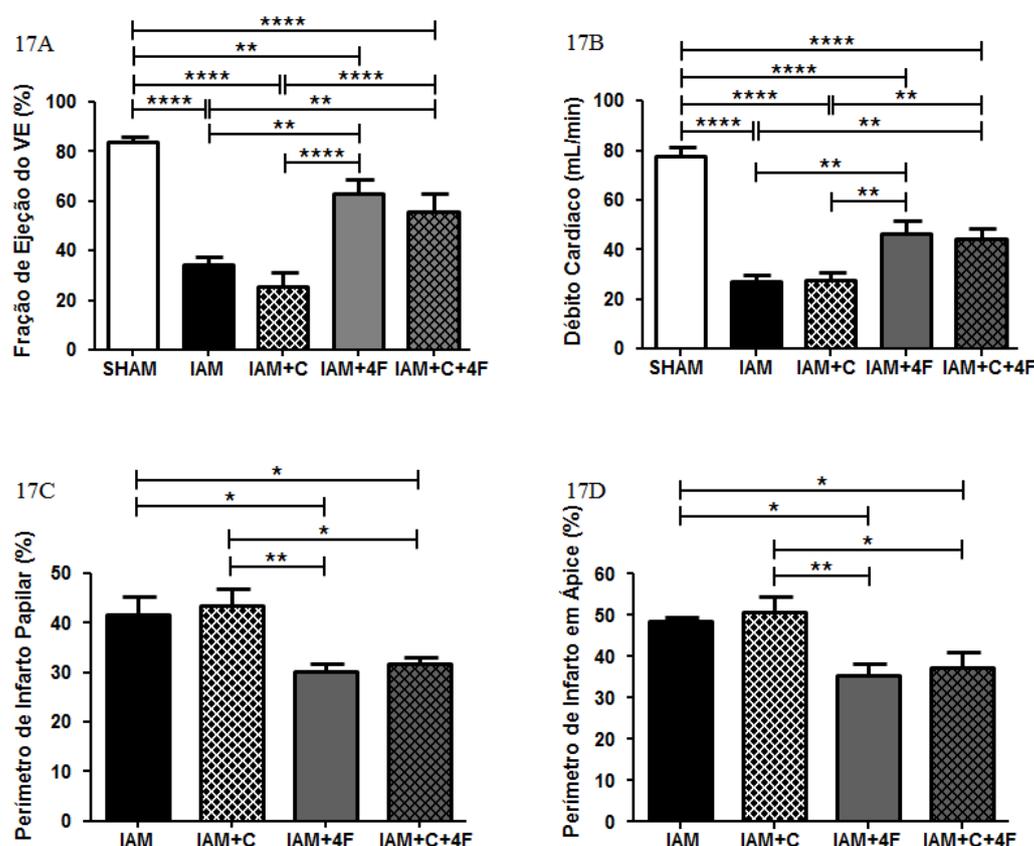
5.9 MEDIDAS DE FUNÇÃO CARDÍACA E HEMODINÂMICA

5.9.1 Medidas de função cardíaca e através do ecocardiograma com 24 h após a indução do IAM;

Como podemos observar na figura 17A e 17B, tabela 17, há redução significativa da fração de ejeção e do débito cardíaco nos grupos IAM e IAM+C.

Como observado nos grupos IAM+4F e IAM+C+4F na figura 17A, 17B e tabela 17 o tratamento melhorou significativamente a função ventricular. A área de infarto foi mensurada na região de ápice e papilar do miocárdio através do exame de ecocardiograma na figura 17C, 17D e tabela 17 apresentando uma melhora da vascularização da área isquêmica nos grupos IAM+4F e IAM+C+4F.

Figura 17A, 17B, 17C e 17D. Ecocardiograma 24 horas após a indução do IAM. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (n=8 animais por grupo).

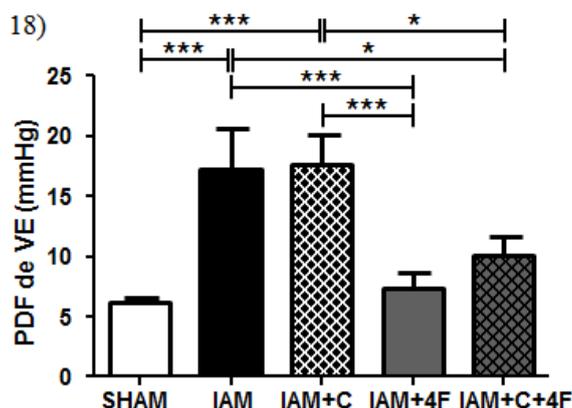


^a $p < 0,0001$ vs. Sham; ^b $p < 0,0001$ vs. IAM+4F; ^c $p < 0,0001$ vs. IAM+C+4F; ^g $p < 0,01$ vs. Sham; ^h $p < 0,01$ vs. IAM+4F; ⁱ $p < 0,01$ vs. IAM+C+4F; ^k $p < 0,05$ vs. IAM+4F; ^l $p < 0,05$ vs. IAM+C+4F. Dados expressos em média \pm EPM.

5.9.2 Medidas de função cardíaca através da medida direta PDFVE com 24 h após a indução do IAM;

A PDF de VE estava aumentada nos grupos IAM e IAM+C em relação ao grupo Sham. Houve normalização desta pressão com o tratamento nos grupos IAM+4F e IAM+C+4F, representados na figura.18 e tabela 18.

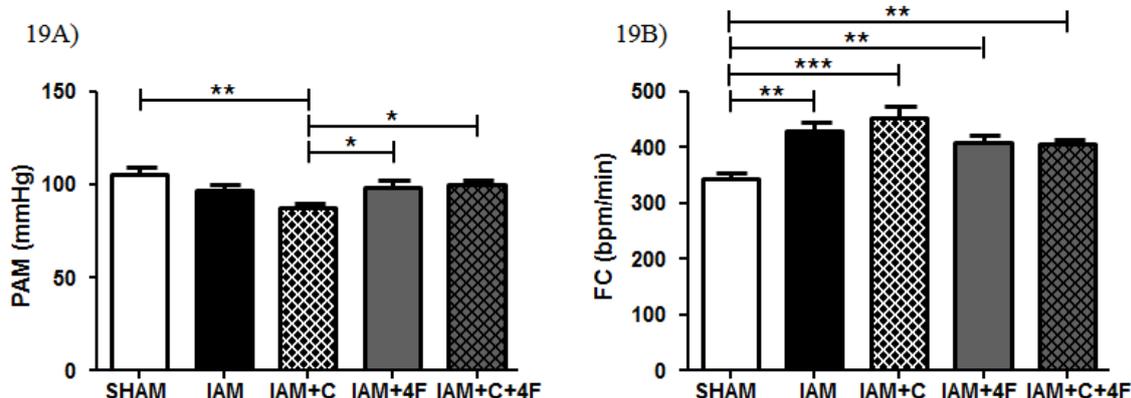
Figura 18. Medida de PDFVE 24 horas após a indução do IAM. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (n=8 animais por grupo).



5.9.3 Medidas de PAM e FC com 24 h após a indução do IAM;

Quando comparamos a PAM 24 h após a indução do IAM na figura 19A e tabela 19, observamos uma diferença estatística do grupo IAM+C, apresentando uma diminuição significativa na PAM que já é esperada neste modelo de infarto, sendo que o grupo IAM não apresentou diferença. Mas foi recuperada nos grupos IAM e IAM+C+4F juntamente com o grupo Sham. Entretanto, os grupos IAM, IAM+C não apresentaram diferença em comparação com os grupos IAM+4F e IAM+C+4F, mas houve diferença estatística dos grupos sem e com tratamento em comparação com o grupo Sham apresentando um aumento na FC, após a indução do IAM na figura 19B e tabela 19. Portanto evidenciamos que o grupo IAM+C apresentou uma diminuição da PAM associado ao aumento da FC.

Figura 19A e 19B. Avaliação hemodinâmica da PAM e FC 24 horas após a indução do IAM. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (n=8 animais por grupo).



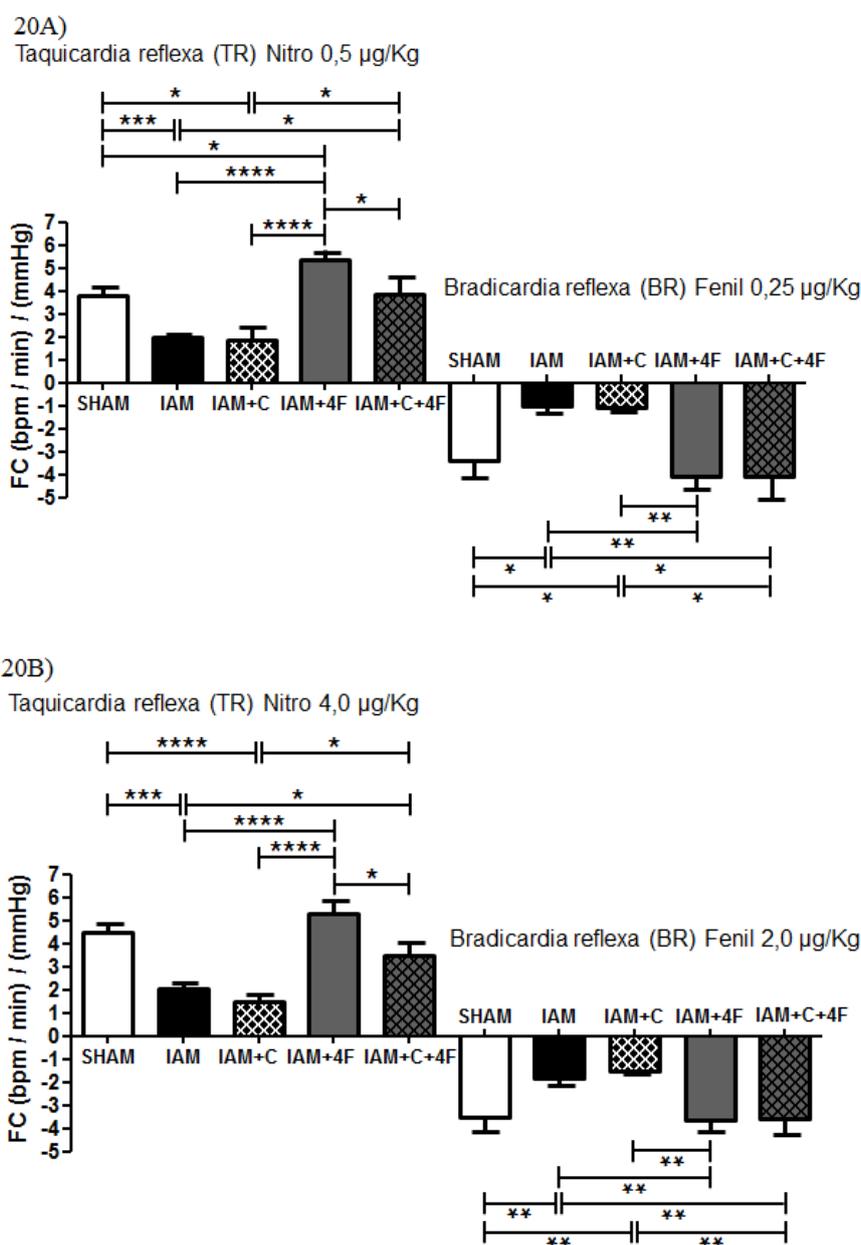
5.9.4 Medidas da resposta dos barorreceptores com 24 h após a indução do IAM;

No estudo da resposta dos barorreceptores obtivemos dados extremamente interessantes. A taquicardia reflexa induzida pelo nitroprussiato tanto em baixa dose 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (fig.20A), quanto em

alta dose 4.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (fig.20B) está alterada nos grupos IAM e IAM+C. Isto quer dizer que o grupo IAM + C, frente a alterações da PAM (queda), não consegue uma resposta da FC adequada frente a este estímulo taquicardizante. O tratamento com 4F restabeleceu esta resposta dos barorreceptores (fig.20A, 20B e tabela 20).

O mesmo se explica para o estudo da resposta dos barorreceptores frente a um estímulo bradicardizante. A bradicardia reflexa induzida pela fenilefrina tanto em baixa 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (fig 20A) quanto em alta dose 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (fig.20B) está alterada nos animais com IAM e IAM+C. Nos animais tratados com 4F, esta resposta está recuperada (Fig.20A, 20B e tabela 20).

Figuras 20A e 20B. Estudo da resposta dos barorreceptores 24 horas após a indução do IAM. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ (n=8 animais por grupo).



6 DISCUSSÃO

Esse é o primeiro estudo que caracteriza os efeitos da apolipoproteína AI na disfunção renal e cardíaca após infarto do miocárdio em ratos hipercolesterolemicos que receberam contraste.

6.1 MODELO DE DISFUNÇÃO CARDÍACA E RENAL ASSOCIADA AO INFARTO DO MIOCÁRDIO

Sabendo que a cirurgia cardíaca para indução do infarto do miocárdio em animais é utilizada para mimetizar o quadro de disfunção ventricular, observado em humanos, e com o intuito de confirmar a disfunção cardíaca no modelo animal proposto, foi parte deste estudo uma caracterização inicial do fenótipo dos animais 24 horas após a cirurgia de ligadura da artéria coronária descendente anterior. Para isso, avaliamos parâmetros morfofuncionais cardíacos e fisiológicos nos grupos estudados.^(17, 18, 81)

6.2 ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS CARDÍACAS E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS EM MODELO ANIMAL DE DISFUNÇÃO CARDÍACA ASSOCIADA AO INFARTO DO MIOCÁRDIO

Inicialmente avaliamos a função e estrutura cardíaca por meio do exame ecocardiográfico 24 horas após a indução do infarto do miocárdio. Como observado nos resultados, 24h após a cirurgia de ligadura da artéria coronária os grupos IAM e IAM+C apresentaram uma redução da fração de ejeção, do débito cardíaco e aumento da área de infarto contribuindo para a disfunção ventricular. Entretanto houve uma melhora significativa nos animais tratados com a 4F, a utilização do ecocardiograma na avaliação morfofuncional cardíaca é extremamente recomendada para fins de prognóstico e como indicadores de progressão da disfunção ventricular e suas variáveis são utilizadas para a identificação da síndrome tanto em humanos, quanto em roedores.^(17, 83)

Acreditamos que a disfunção ventricular esquerda observada nesses animais foi consequência da perda exacerbada de tecido contrátil cardíaco decorrente do processo isquêmico, visto que após a cirurgia os animais apresentaram uma área infartada em torno de 40% da área cardíaca total.^(18, 84)

Além das alterações ecocardiográficas, os grupos IAM e IAM+C apresentaram aumento da Pressão diastólica final (PDF) do ventrículo esquerdo (VE) que tem uma importância hemodinâmica significativa por ser aferida dentro da cavidade ventricular esquerda dos animais infartados e registra as pressões de enchimento do ventrículo que determina alterações hemodinâmica e foi revertida com o tratamento da 4F nos grupos IAM+4F e IAM+C+4F.⁽⁸⁵⁾

Também avaliamos a troponina I no plasma que é um marcador padrão ouro da lesão isquêmica do miocárdio. Os resultados mostraram uma alteração significativa nos animais infartados sem tratamento (IAM e IAM+C) em comparação com os grupos que receberam o tratamento (IAM+4F e

IAM+C+4F). A eficácia do método foi confirmada quando comparada com o grupo sham que não apresentou alterações dos níveis plasmáticos.⁽¹⁹⁾

Os resultados sugerem que a diminuição do débito cardíaco está associada a redução do volume arterial efetivo dos órgãos. Falência da performance cardíaca, como vemos nos animais com insuficiência cardíaca, contribui para piora da sobrevida em pacientes infartados.³¹ A apolipoproteína AI restaurou a performance cardíaca (melhorando o débito cardíaco, a fração de ejeção, área de infarto, a PDF de VE e troponina I).

É importante relatar que associado a essas alterações cardíacas encontramos aumento da expressão de células positivas para TLR4 no coração visto por imuno-histoquímica e associado a diminuição da expressão de proteínas de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e aumento do lactato nos animais dos grupos IAM e IAM+C sinalizando um aumento da inflamação no tecido cardíaco. O mesmo é observado em outros estudos com piora da função cardíaca, mas os animais tratados IAM+4F e IAM+C+4F apresentaram uma melhora significativa deste marcador.^(75, 86-89)

As alterações estudadas no coração constitui a base para o melhor entendimento dos efeitos decorrentes do infarto do miocárdio, visto que a mitocôndria é peça fundamental na manutenção da viabilidade e funcionalidade do cardiomiócito os animais dos grupos IAM e IAM+C apresentaram um aumento significativo no número de mitocôndrias na área de infarto com alteração nas cristas mitocondriais e formação de balão em sua estrutura

Conforme descrito nos resultados, encontramos mudanças na morfologia da organela, representado pelo maior número de mitocôndrias com diminuição das fibras musculares nos corações dos animais IAM e IAM+C. Acreditamos que a sobreposição da fissão mitocondrial em detrimento à fusão da organela pode estar associada à essa resposta. Existem trabalhos correlacionando uma redução na expressão da proteína Parkin com a autofagia mitocondrial (aumento na quantidade de mitocôndrias com área reduzida) observada pela técnica de microscopia eletrônica em animais infartados.^(90, 91)

Os resultados corroboram e indicam que prejuízos na função mitocondrial não podem ser compensados pelo aumento no número de mitocôndrias, e que um balanço apropriado na estrutura da organela se faz necessário para a manutenção da homeostase cardíaca nos ratos infartados.

A produção energética no tecido cardíaco não está relacionada somente à morfologia mitocondrial, mas também está envolvido na organização estrutural das organelas, representada pela densidade e sua localização. Em função da contínua demanda de energia gerada por ATP, os cardiomiócitos adultos apresentam mitocôndrias extremamente densas quando comparados a outros tecidos, uma vez que além de participar efetivamente da síntese de ATP via fosforilação oxidativa, a organela também participa da sinalização do Ca²⁺, proliferação celular e apoptose.⁽⁹²⁻⁹⁴⁾

Quando investivamos a via de apoptose através da expressão de tunel positivo por imunofluorescência no tecido cardíaco observamos um aumento nos grupos IAM e IAM+C que está

associado ao aumento da proteína de VEGF por western blot e diminuição da angiogênese representado pela expressão de isolectina B4 em tecido cardíaco na imunofluorescência. Entretanto os grupos que receberam o tratamento da 4F (IAM+4F e IAM+C+4F) apresentaram melhora significativa de todos esses marcadores de apoptose no tecido cardíaco.⁽⁹⁵⁻⁹⁸⁾

Em conjunto, nossos dados demonstram uma contribuição importante da função cardíaca atribuído ao tratamento da 4F que foi confirmado pelo aumento significativo da expressão de apolipoproteína AI no tecido cardíaco dos grupos IAM+4F e IAM+C+4F por western blot. Nossos dados do perfil lipídico relatam uma diferença sigificante no aumento do HDL, diminuição da LDL, diminuição do VLDL e triglicerídeos plasmático dos animais tratados quando comparado com os grupos IAM, IAM+C. Em vários estudos encontramos estes resultados associados a melhora da doença cardíaca.^(46, 66, 74, 99)

6.3 ALTERAÇÕES RENAIIS E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS EM MODELO ANIMAL DE DISFUNÇÃO CARDÍACA ASSOCIADA AO INFARTO DO MIOCÁRDIO

Neste estudo observou-se uma redução importante da filtração glomerular medida pelo clearance de creatinina associado a redução do fluxo urinário nos grupos IAM e IAM+C que foi completamente revertida nos grupos IAM+4F e IAM+C+4F que receberam o tratamento. Entretanto os grupos tratados mesmo com um aumento significativo do fluxo urinário não apresentaram diferença significativa das frações de excreção de sódio, fração de excreção de potássio e osmolalidade urinária com 24h após indução do infarto.⁽⁸⁾

Importante ressaltar que associado a queda da filtração glomerular, houve algumas alterações estruturais renais, tais como: aumento das células CD 68 positivas por imuno-histoquímica associado a diminuição da expressão de proteína eNOS por western blot e aumento do lactato plasmático como foi relatado nas alterações cardíacas. Podemos afirmar que houve um cross-talk entre o coração e sistema renal através de uma interação inflamatória que foi demonstrada por alterações significativas dos grupos IAM e IAM+C quando comparada com os grupos SHAM, IAM+4F e IAM+C+4F.^(72, 100)

Além disso, existe também importante comprometimento de proteína relacionada com a integridade vascular do endotélio, o que poderia justificar a disfunção endotelial ocorra após a isquemia e venha sendo considerada como uma consequência do comprometimento da liberação de NO, (o que é também observado no paciente com infarto). A nossa hipótese se baseia em que, com a alteração da proteína responsável pela integridade endotelial (e-NOS). Todos estes eventos estariam associados à diminuição da apo AI no tecido renal.⁽¹⁰¹⁾

Acreditamos que os achados das alterações renais também estão relacionados com a inflamação, estresse oxidativo, proliferação celular e apoptose semelhantes as alterações cardíacas. Nossos resultados demonstram um aumento significativos da expressão de células túnel positivas por

imuno-histoquímica, aumento da expressão de proteína VEGF por western blot e associado a alterações morfológicas das mitocôndrias que estão relacionadas a morte celular por apoptose nos grupos IAM e IAM+C. Entretanto o tratamento com a 4F também reverteu as alterações renais nos grupos IAM+4F e IAM+C+4F quando comparamos todos os grupos com o SHAM. Estes resultados podem contribuir com um melhor entendimento da lesão renal aguda nos eventos cardiológicos.⁽¹⁰²⁻¹⁰⁶⁾

Os resultados do presente estudo mostram que o tratamento com a 4F foi positivo no tecido renal apresentando um aumento significativo da expressão de apolipoproteína AI nos grupos IAM+4F e IAM+C+4F em comparação com os animais dos grupos SHAM, IAM e IAM+C. Reduzindo a área de infarto, atenuando as alterações nos níveis de HDL, melhorando o desempenho cardíaco e a função renal em ratos infartados com uso de contraste.^(46, 66, 74, 99)

6.4 ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS NO MODELO ANIMAL DE DISFUNÇÃO CARDÍACA ASSOCIADA AO INFARTO DO MIOCÁRDIO

A resposta dos barorreceptores também se encontra alterada. Houve alteração da PAM nos animais com IAM+C associado a um aumento da FC em relação aos animais sham e tratados. Entretanto, o grupo IAM não apresentou alteração significativa. Estudos demonstram que estas alterações na resposta dos barorreceptores estão associadas a um aumento da morbidade.⁽¹⁰⁷⁾

Redução do HDL está correlacionada com o comprometimento da função cardíaca em pacientes com síndrome da resposta inflamatória sistêmica.^(74, 108) Em nosso estudo, os animais com IAM e IAM+C, o LDL estava significativamente aumentado. A natureza pró-inflamatória do LDL tem sido atribuída à liberação de citotóxicos e peroxidação lipídica.⁽⁴⁶⁾ O LDL oxidado altera o endotélio e leva a sua disfunção. Recentemente, demonstraram que o peptídeo 4F previne a peroxidação lipídica.⁽⁴⁶⁾ Dados sugerem que o 4F induz a formação de novas partículas de HDL que são enriquecidas em paraoxonase, uma enzima que degrada peróxidos lipídicos.⁽⁶⁹⁾

A administração do peptídeo 4F aumenta a atividade da paraoxonase, diminui a síntese e a liberação de citocinas, além de diminuir o stress oxidativo.^(69, 109)

Em um estudo recente, foi demonstrado que o HDL na faixa normal parece ser completamente protetor contra a disfunção da proteína klotho.⁽¹¹⁰⁾ Com envelhecimento as concentrações plasmáticas de HDL vão diminuindo.⁽¹¹⁰⁾ Diminuição da concentração sérica de HDL e da sua função pode ocorrer secundária a alterações hormonais, processos inflamatórios, e diabetes mellitus.^(110, 111) A deficiência de HDL é extremamente rara entre os centenários. O HDL pode modular o processo de envelhecimento, não só pela sua bem conhecida atividade antiaterogênica, mas possivelmente também por interferir diretamente com o envelhecimento pela sinalização da proteína klotho. A maioria dos resultados atuais, no entanto, baseia-se em cultura de células. Não existe ainda confirmação *in vivo*.⁽⁵⁸⁾

Em uma doença extremamente agressiva como o infarto, o tratamento com o peptídeo 4F pode ser uma grande opção terapêutica.⁽⁷⁶⁾

O sistema barorreflexo é responsável por manter a homeostase cardiovascular e preservar o fluxo sanguíneo para os órgãos vitais.⁽¹¹²⁾ Sabe-se que no infarto, existe uma relação direta entre sensibilidade dos barorreceptores e sobrevivência, que está diminuída quando existe disfunção da resposta barorreflexa.⁽¹⁰⁷⁾ Tem sido descrito que a atividade da eNOS está diminuída nas células endoteliais quando expostas ao LDL.⁽¹¹³⁾ Também é descrito que o LDL oxidado pode alterar a expressão da eNOS.⁽¹¹⁴⁾ Alteração da variabilidade da FC e da PAM, determinada em parte por uma disfunção endotelial dependente do óxido nítrico, estão relacionados a um prognóstico adverso nas doenças cardiovasculares. Pelet e colaboradores demonstraram que a Rosuvastatina diminui a expressão da caveolina-1 (um inibidor de eNOS) e promove a melhora da função da eNOS em camundongos dislipidêmicos *knockouts* para apo E, com melhora nestes animais da variabilidade da FC e da PAM.⁽¹¹⁵⁾ Nós demonstramos uma disfunção do sistema baroreceptor nos animais com IAM e IAM+C. Maiores estudos terão de ser feitos para identificar se a melhora da sensibilidade barorreflexa, em animais tratados com a apolipoproteína AI, é devido a um aumento da expressão da eNOS. Além disso, esta melhora também pode ser devida ao aumento dos níveis séricos de HDL e diminuição dos níveis séricos de LDL.

A mortalidade de pacientes com doença cardiovascular associado a injúria renal aguda atinge grande parte da população.⁽⁸⁾

No nosso estudo, houve normalização da função renal (medida pelo clearance de creatinina) com o tratamento com a apolipoproteína AI.

Portanto, o tratamento com a Apo AI 4F, leva a efeitos anti-inflamatórios, melhora a função cardíaca e renal. Demonstramos também que, neste modelo de infarto, há uma disfunção da resposta barorreflexa. O tratamento, associado a um aumento dos níveis de HDL, provavelmente, levou a uma proteção do endotélio. Esta proteção endotelial pode ser interpretada pela melhor expressão de eNOS.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que o uso de contraste nos animais hipercolesterolêmicos com IAM, contribui sobremaneira para o agravamento da disfunção cardíaca e renal.

E com base nos resultados, podemos afirmar que a 4F, através de via dependente de HDL, utilizada atualmente como estratégia terapêutica no tratamento das doenças cardiovasculares, é capaz de reverter as alterações na função cardíaca e renal dos animais infartados. Dessa forma, concluímos que a 4F exerce importante papel na proteção com efeitos benéficos na manutenção da integridade endotelial, melhora da função contrátil do miocárdio e sistema renal. Sendo assim, encontrar a maneira



mais efetiva de tratamento com a 4F nas doenças cardiovasculares e renais representam um importante passo para o futuro das pesquisas no tratamento da síndrome cardiorenal.



REFERÊNCIAS

PAHO/WHO. 2016. Disponível em: <<http://www.paho.org/hq/>> [

Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics--2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133(4):447-54.

Sood V, Chakravarti RN. Systemic stress in the production of cardiac thrombosis in hypercholesterolaemic rats. *Res Exp Med (Berl)*. 1976;167(1):31-45.

Ma X, Feng Y. Hypercholesterolemia Tunes Hematopoietic Stem/Progenitor Cells for Inflammation and Atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(7).

Stokes KY, Calahan L, Hamric CM, Russell JM, Granger DN. CD40/CD40L contributes to hypercholesterolemia-induced microvascular inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296(3):H689-97.

Lou-Bonafonte JM, Arnal C, Navarro MA, Osada J. Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development. *Mol Nutr Food Res*. 2012;56(7):1043-57.

Sherman CB, Peterson SJ, Frishman WH. Apolipoprotein A-I mimetic peptides: a potential new therapy for the prevention of atherosclerosis. *Cardiol Rev*. 2010;18(3):141-7.

Vaziri ND, Bai Y, Yuan J, Said HL, Sigala W, Ni Z. ApoA-1 mimetic peptide reverses uremia-induced upregulation of pro-atherogenic pathways in the aorta. *Am J Nephrol*. 2010;32(3):201-11.

Maczewski M, Maczewska J. Hypercholesterolemia exacerbates ventricular remodeling in the rat model of myocardial infarction. *J Card Fail*. 2006;12(5):399-405.

Maczewski M, Maczewska J, Duda M. Hypercholesterolaemia exacerbates ventricular remodelling after myocardial infarction in the rat: role of angiotensin II type 1 receptors. *Br J Pharmacol*. 2008;154(8):1640-8.

Weissberg PL. Atherogenesis: current understanding of the causes of atheroma. *Heart*. 2000;83(2):247-52.

Wu N, Zhang X, Jia P, Jia D. Hypercholesterolemia aggravates myocardial ischemia reperfusion injury via activating endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Exp Mol Pathol*. 2015;99(3):449-54.

Lu S, Du P, Shan C, Wang Y, Ma C, Dong J. Haploinsufficiency of Hand1 improves mice survival after acute myocardial infarction through preventing cardiac rupture. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016.

Chae CU, Albert CM, Moorthy MV, Lee IM, Buring JE. Vitamin E supplementation and the risk of heart failure in women. *Circ Heart Fail*. 2012;5(2):176-82.

Rodrigues B, Mostarda CT, Jorge L, Barboza CA, Grans CF, De Angelis K, et al. Impact of myocardial infarction on cardiac autonomic function in diabetic rats. *J Diabetes Complications*. 2013;27(1):16-22.

Rabald S, Hagendorff A, Pfeiffer D, Zimmer HG, Deten A. Contrast enhanced echocardiographic follow-up of cardiac remodeling and function after myocardial infarction in rats. *Ultrasound Med Biol*. 2007;33(10):1561-71.



Morgan EE, Faulx MD, McElfresh TA, Kung TA, Zawaneh MS, Stanley WC, et al. Validation of echocardiographic methods for assessing left ventricular dysfunction in rats with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287(5):H2049-53.

Sjaastad I, Sejersted OM, Ilebekk A, Bjornerheim R. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Physiol* (1985). 2000;89(4):1445-54.

Frobert A, Valentin J, Magnin JL, Riedo E, Cook S, Giraud MN. Prognostic Value of Troponin I for Infarct Size to Improve Preclinical Myocardial Infarction Small Animal Models. *Front Physiol.* 2015;6:353.

Gu SS, Shi N, Wu MP. The protective effect of ApolipoproteinA-I on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Life Sci.* 2007;81(9):702-9.

Rodrigues F, Feriani DJ, Barboza CA, Absamra ME, Rocha LY, Carrozi NM, et al. Cardioprotection afforded by exercise training prior to myocardial infarction is associated with autonomic function improvement. *BMC Cardiovasc Disord.* 2014;14:84.

Penumathsa SV, Thirunavukkarasu M, Koneru S, Juhasz B, Zhan L, Pant R, et al. Statin and resveratrol in combination induces cardioprotection against myocardial infarction in hypercholesterolemic rat. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;42(3):508-16.

Yang J, Guo X, Ding JW, Li S, Yang R, Fan ZX, et al. RP105 Protects Against Apoptosis in Ischemia/Reperfusion-Induced Myocardial Damage in Rats by Suppressing TLR4-Mediated Signaling Pathways. *Cell Physiol Biochem.* 2015;36(6):2137-48.

Aspelin P, Aubry P, Fransson SG, Strasser R, Willenbrock R, Berg KJ, et al. Nephrotoxic effects in high-risk patients undergoing angiography. *N Engl J Med.* 2003;348(6):491-9.

Bakris GL, Lass N, Gaber AO, Jones JD, Burnett JC. Radiocontrast medium-induced declines in renal function: a role for oxygen free radicals. *Am J Physiol.* 1990;258(1 Pt 2):F115-20.

Barrett BJ. Contrast nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol.* 1994;5(2):125-37.

Andrade L, Campos SB, Seguro AC. Hypercholesterolemia aggravates radiocontrast nephrotoxicity: protective role of L-arginine. *Kidney Int.* 1998;53(6):1736-42.

Campos SB, Ori M, Dórea EL, Seguro AC. Protective effect of L-arginine on hypercholesterolemia-enhanced renal ischemic injury. *Atherosclerosis.* 1999;143(2):327-34.

Bird JE, Giancarli MR, Megill JR, Durham SK. Effects of endothelin in radiocontrast-induced nephropathy in rats are mediated through endothelin-A receptors. *J Am Soc Nephrol.* 1996;7(8):1153-7.

He X, Li L, Tan H, Chen J, Zhou Y. Atorvastatin attenuates contrast-induced nephropathy by modulating inflammatory responses through the regulation of JNK/p38/Hsp27 expression. *J Pharmacol Sci.* 2016;131(1):18-27.

Gleeson TG, Bulughapitiya S. Contrast-induced nephropathy. *AJR Am J Roentgenol.* 2004;183(6):1673-89.



Taliercio CP, Vlietstra RE, Fisher LD, Burnett JC. Risks for renal dysfunction with cardiac angiography. *Ann Intern Med.* 1986;104(4):501-4.

Calzavacca P, Ishikawa K, Bailey M, May CN, Bellomo R. Systemic and renal hemodynamic effects of intra-arterial radiocontrast. *Intensive Care Med Exp.* 2014;2(1):32.

Gibson CM, Pinto DS, Murphy SA, Morrow DA, Hobbach HP, Wiviott SD, et al. Association of creatinine and creatinine clearance on presentation in acute myocardial infarction with subsequent mortality. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42(9):1535-43.

Wodzig KW, Kragten JA, Hermens WT, Glatz JF, van Dieijen-Visser MP. Estimation of myocardial infarct size from plasma myoglobin or fatty acid-binding protein. Influence of renal function. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1997;35(3):191-8.

Cruz DN, Goh CY, Palazzuoli A, Slavin L, Calabrò A, Ronco C, et al. Laboratory parameters of cardiac and kidney dysfunction in cardio-renal syndromes. *Heart Fail Rev.* 2011;16(6):545-51.

Chevalier RL. The proximal tubule is the primary target of injury and progression of kidney disease: role of the glomerulotubular junction. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016;311(1):F145-61.

Gandhi S, Mosleh W, Abdel-Qadir H, Farkouh ME. Statins and contrast-induced acute kidney injury with coronary angiography. *Am J Med.* 2014;127(10):987-1000.

Ledvényiová-Farkašová V, Bernátová I, Balis P, Puzserova A, Barteková M, Gablovsky I, et al. Effect of crowding stress on tolerance to ischemia-reperfusion injury in young male and female hypertensive rats: molecular mechanisms. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015;93(9):793-802.

Nishizawa M, Kumagai H, Ichikawa M, Oshima N, Suzuki H, Saruta T. Improvement in baroreflex function by an oral angiotensin receptor antagonist in rats with myocardial infarction. *Hypertension.* 1997;29(1 Pt 2):458-63.

Heringer-Walther S, Batista EN, Walther T, Khosla MC, Santos RA, Campagnole-Santos MJ. Baroreflex improvement in shr after ace inhibition involves angiotensin-(1-7). *Hypertension.* 2001;37(5):1309-14.

Fan W, Reynolds PJ, Andresen MC. Baroreflex frequency-response characteristics to aortic depressor and carotid sinus nerve stimulation in rats. *Am J Physiol.* 1996;271(6 Pt 2):H2218-27.

Tao X, Zhang SH, Chu ZX, Su DF. Apoptosis is involved in the cardiac damage induced by sinoaortic denervation in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003;30(5-6):362-8.

Stein RD, Backman SB, Collier B, Polosa C. Bradycardia produced by pyridostigmine and physostigmine. *Can J Anaesth.* 1997;44(12):1286-92.

Rosenson RS, Brewer HB, Ansell BJ, Barter P, Chapman MJ, Heinecke JW, et al. Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2016;13(1):48-60.

Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, et al. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest.* 1995;96(6):2758-67.



Chapman MJ, Assmann G, Fruchart JC, Shepherd J, Sirtori C, HDL-C ECPo. Raising high-density lipoprotein cholesterol with reduction of cardiovascular risk: the role of nicotinic acid--a position paper developed by the European Consensus Panel on HDL-C. *Curr Med Res Opin.* 2004;20(8):1253-68.

Assmann G, Nofer JR. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. *Annu Rev Med.* 2003;54:321-41.

Brown MS, Goldstein JL. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci Am.* 1984;251(5):58-66.

Arora S, Patra SK, Saini R. HDL-A molecule with a multi-faceted role in coronary artery disease. *Clin Chim Acta.* 2016;452:66-81.

Shih AY, Sligar SG, Schulten K. Maturation of high-density lipoproteins. *J R Soc Interface.* 2009;6(39):863-71.

Datta G, Chaddha M, Hama S, Navab M, Fogelman AM, Garber DW, et al. Effects of increasing hydrophobicity on the physical-chemical and biological properties of a class A amphipathic helical peptide. *J Lipid Res.* 2001;42(7):1096-104.

Nagao K, Hata M, Tanaka K, Takechi Y, Nguyen D, Dhanasekaran P, et al. The roles of C-terminal helices of human apolipoprotein A-I in formation of high-density lipoprotein particles. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1841(1):80-7.

Vedhachalam C, Chetty PS, Nickel M, Dhanasekaran P, Lund-Katz S, Rothblat GH, et al. Influence of apolipoprotein (Apo) A-I structure on nascent high density lipoprotein (HDL) particle size distribution. *J Biol Chem.* 2010;285(42):31965-73.

Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Hama S, Hough G, Grijalva VR, et al. Apolipoprotein A-I mimetic peptides. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(7):1325-31.

Van Lenten BJ, Wagner AC, Jung CL, Ruchala P, Waring AJ, Lehrer RI, et al. Anti-inflammatory apoA-I-mimetic peptides bind oxidized lipids with much higher affinity than human apoA-I. *J Lipid Res.* 2008;49(11):2302-11.

Epand RM, Epand RF, Sayer BG, Datta G, Chaddha M, Anantharamaiah GM. Two homologous apolipoprotein AI mimetic peptides. Relationship between membrane interactions and biological activity. *J Biol Chem.* 2004;279(49):51404-14.

Walter M. Interrelationships among HDL metabolism, aging, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(9):1244-50.

Navab M, Anantharamaiah GM, Hama S, Garber DW, Chaddha M, Hough G, et al. Oral administration of an Apo A-I mimetic Peptide synthesized from D-amino acids dramatically reduces atherosclerosis in mice independent of plasma cholesterol. *Circulation.* 2002;105(3):290-2.

Nandedkar SD, Weihrauch D, Xu H, Shi Y, Feroah T, Hutchins W, et al. D-4F, an apoA-1 mimetic, decreases airway hyperresponsiveness, inflammation, and oxidative stress in a murine model of asthma. *J Lipid Res.* 2011;52(3):499-508.

Rosenbaum MA, Chaudhuri P, Abelson B, Cross BN, Graham LM. Apolipoprotein A-I mimetic peptide reverses impaired arterial healing after injury by reducing oxidative stress. *Atherosclerosis.* 2015;241(2):709-15.



Garber DW, Datta G, Chaddha M, Palgunachari MN, Hama SY, Navab M, et al. A new synthetic class A amphipathic peptide analogue protects mice from diet-induced atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2001;42(4):545-52.

Li X, Chyu KY, Faria Neto JR, Yano J, Nathwani N, Ferreira C, et al. Differential effects of apolipoprotein A-I-mimetic peptide on evolving and established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation.* 2004;110(12):1701-5.

Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Fogelman AM. Apolipoprotein A-I mimetic peptides and their role in atherosclerosis prevention. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006;3(10):540-7.

Navab M, Anantharamaiah GM, Fogelman AM. The effect of apolipoprotein mimetic peptides in inflammatory disorders other than atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2008;18(2):61-6.

Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Buga GM, Fogelman AM. Peptide Mimetics of Apolipoproteins Improve HDL Function. *J Clin Lipidol.* 2007;1(2):142-7.

Han J, Zhang S, Ye P, Liu YX, Qin YW, Miao DM. Apolipoprotein A-I Mimetic Peptide D-4F Reduces Cardiac Hypertrophy and Improves Apolipoprotein A-I-Mediated Reverse Cholesterol Transport From Cardiac Tissue in LDL Receptor-null Mice Fed a Western Diet. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2016;67(5):412-7.

Osei-Hwedieh DO, Amar M, Sviridov D, Remaley AT. Apolipoprotein mimetic peptides: Mechanisms of action as anti-atherogenic agents. *Pharmacol Ther.* 2011;130(1):83-91.

Wu A, Hinds CJ, Thiemermann C. High-density lipoproteins in sepsis and septic shock: metabolism, actions, and therapeutic applications. *Shock.* 2004;21(3):210-21.

Anuar F, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK. Flurbiprofen and its nitric oxide-releasing derivative protect against septic shock in rats. *Inflamm Res.* 2006;55(11):498-503.

Dai L, Datta G, Zhang Z, Gupta H, Patel R, Honavar J, et al. The apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F prevents defects in vascular function in endotoxemic rats. *J Lipid Res.* 2010;51(9):2695-705.

Moreira RS, Irigoyen M, Sanches TR, Volpini RA, Camara NO, Malheiros DM, et al. Apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F attenuates kidney injury, heart injury, and endothelial dysfunction in sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2014;307(5):R514-24.

Bloedon LT, Dunbar R, Duffy D, Pinell-Salles P, Norris R, DeGroot BJ, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of oral apoA-I mimetic peptide D-4F in high-risk cardiovascular patients. *J Lipid Res.* 2008;49(6):1344-52.

Pal M, Pillarisetti S. HDL elevators and mimetics--emerging therapies for atherosclerosis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2007;5(1):55-66.

Smythies LE, White CR, Maheshwari A, Palgunachari MN, Anantharamaiah GM, Chaddha M, et al. Apolipoprotein A-I mimetic 4F alters the function of human monocyte-derived macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;298(6):C1538-48.

Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M, et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2003;290(17):2292-300.



Tricoci P, D'Andrea DM, Gurbel PA, Yao Z, Cuchel M, Winston B, et al. Infusion of Reconstituted High-Density Lipoprotein, CSL112, in Patients With Atherosclerosis: Safety and Pharmacokinetic Results From a Phase 2a Randomized Clinical Trial. *J Am Heart Assoc.* 2015;4(8):e002171.

Gilham D, Wasiak S, Tsujikawa LM, Halliday C, Norek K, Patel RG, et al. Corrigendum to "RVX-208, a BET-inhibitor for treating atherosclerotic cardiovascular disease, raises ApoA-I/HDL and represses pathways that contribute to cardiovascular disease" [*Atherosclerosis* 247 (2016) 48-57]. *Atherosclerosis.* 2016.

Graziani G, Degnoni V, Oldani S, Buskermolen M, Brambilla G. [Pathophysiology and prevention of contrast-induced acute renal failure]. *G Ital Nefrol.* 2007;24 Suppl 38:20-4.

Onozato ML, Tojo A, Goto A, Fujita T. Radical scavenging effect of gliclazide in diabetic rats fed with a high cholesterol diet. *Kidney Int.* 2004;65(3):951-60.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res.* 1979;44(4):503-12.

Van Liew JB, Zmlauski-Tucker MJ, Feld LG. Endogenous creatinine clearance in the rat: strain variation. *Life Sci.* 1993;53(12):1015-21.

Wang M, Yip GW, Wang AY, Zhang Y, Ho PY, Tse MK, et al. Tissue Doppler imaging provides incremental prognostic value in patients with systemic hypertension and left ventricular hypertrophy. *J Hypertens.* 2005;23(1):183-91.

Malfitano C, de Souza Junior AL, Carbonaro M, Bolsoni-Lopes A, Figueroa D, de Souza LE, et al. Glucose and fatty acid metabolism in infarcted heart from streptozotocin-induced diabetic rats after 2 weeks of tissue remodeling. *Cardiovasc Diabetol.* 2015;14:149.

Wichi R, Malfitano C, Rosa K, De Souza SB, Salemi V, Mostarda C, et al. Noninvasive and invasive evaluation of cardiac dysfunction in experimental diabetes in rodents. *Cardiovasc Diabetol.* 2007;6:14.

Liu Q, Zhang J, Xu Y, Huang Y, Wu C. Effect of carvedilol on cardiomyocyte apoptosis in a rat model of myocardial infarction: a role for toll-like receptor 4. *Indian J Pharmacol.* 2013;45(5):458-63.

Wei L, Wu RB, Yang CM, Zheng SY, Yu XY. Cardioprotective effect of a hemoglobin-based oxygen carrier on cold ischemia/reperfusion injury. *Cardiology.* 2011;120(2):73-83.

Berges A, Van Nassauw L, Timmermans JP, Vrints C. Time-dependent expression pattern of nitric oxide and superoxide after myocardial infarction in rats. *Pharmacol Res.* 2007;55(1):72-9.

Takata K, Imaizumi S, Kawachi E, Yahiro E, Suematsu Y, Shimizu T, et al. The ApoA-I mimetic peptide FAMP promotes recovery from hindlimb ischemia through a nitric oxide (NO)-related pathway. *Int J Cardiol.* 2016;207:317-25.

Wu L, Maimaitirexiati X, Jiang Y, Liu L. Parkin Regulates Mitochondrial Autophagy After Myocardial Infarction in Rats. *Med Sci Monit.* 2016;22:1553-9.

Shi J, Dai W, Hale SL, Brown DA, Wang M, Han X, et al. Bendavia restores mitochondrial energy metabolism gene expression and suppresses cardiac fibrosis in the border zone of the infarcted heart. *Life Sci.* 2015;141:170-8.

Wang JX, Jiao JQ, Li Q, Long B, Wang K, Liu JP, et al. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat Med.* 2011;17(1):71-8.

McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol.* 2006;16(14):R551-60.

Kuznetsov AV, Javadov S, Sickinger S, Frotschnig S, Grimm M. H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1853(2):276-84.

Suematsu Y, Miura S, Takata K, Shimizu T, Kuwano T, Imaizumi S, et al. A novel inducible cholesterol efflux peptide, FAMP, protects against myocardial ischemia reperfusion injury through a nitric oxide pathway. *Int J Cardiol.* 2016;202:810-6.

Hao X, Månsson-Broberg A, Grinnemo KH, Siddiqui AJ, Dellgren G, Brodin LA, et al. Myocardial angiogenesis after plasmid or adenoviral VEGF-A(165) gene transfer in rat myocardial infarction model. *Cardiovasc Res.* 2007;73(3):481-7.

Kanashiro-Takeuchi RM, Takeuchi LM, Rick FG, Dulce R, Treuer AV, Florea V, et al. Activation of growth hormone releasing hormone (GHRH) receptor stimulates cardiac reverse remodeling after myocardial infarction (MI). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(2):559-63.

Wang G, Hamid T, Keith RJ, Zhou G, Partridge CR, Xiang X, et al. Cardioprotective and antiapoptotic effects of heme oxygenase-1 in the failing heart. *Circulation.* 2010;121(17):1912-25.

Ou J, Wang J, Xu H, Ou Z, Sorci-Thomas MG, Jones DW, et al. Effects of D-4F on vasodilation and vessel wall thickness in hypercholesterolemic LDL receptor-null and LDL receptor/apolipoprotein A-I double-knockout mice on Western diet. *Circ Res.* 2005;97(11):1190-7.

Buga GM, Frank JS, Mottino GA, Hakhamian A, Narasimha A, Watson AD, et al. D-4F reduces EO6 immunoreactivity, SREBP-1c mRNA levels, and renal inflammation in LDL receptor-null mice fed a Western diet. *J Lipid Res.* 2008;49(1):192-205.

Leman LJ, Maryanoff BE, Ghadiri MR. Molecules that mimic apolipoprotein A-I: potential agents for treating atherosclerosis. *J Med Chem.* 2014;57(6):2169-96.

Gui D, Huang J, Liu W, Guo Y, Xiao W, Wang N. Astragaloside IV prevents acute kidney injury in two rodent models by inhibiting oxidative stress and apoptosis pathways. *Apoptosis.* 2013;18(4):409-22.

Xu Z, Prathapasinghe G, Wu N, Hwang SY, Siow YL, O K. Ischemia-reperfusion reduces cystathionine-beta-synthase-mediated hydrogen sulfide generation in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;297(1):F27-35.

Qi S, Wu D. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced acute kidney injury in rats by inhibiting cell apoptosis. *Int J Mol Med.* 2013;32(6):1262-72.

O'Toole JF, Patel HV, Naples CJ, Fujioka H, Hoppel CL. Decreased cytochrome c mediates an age-related decline of oxidative phosphorylation in rat kidney mitochondria. *Biochem J.* 2010;427(1):105-12.



Szeto HH, Liu S, Soong Y, Wu D, Darrah SF, Cheng FY, et al. Mitochondria-targeted peptide accelerates ATP recovery and reduces ischemic kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(6):1041-52.

Mostarda C, Moraes-Silva IC, Moreira ED, Medeiros A, Piratello AC, Consolim-Colombo FM, et al. Baroreflex sensitivity impairment is associated with cardiac diastolic dysfunction in rats. *J Card Fail.* 2011;17(6):519-25.

Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Hough G, Wagner A, et al. Human apolipoprotein AI mimetic peptides for the treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Investig Drugs.* 2003;4(9):1100-4.

Van Lenten BJ, Wagner AC, Anantharamaiah GM, Garber DW, Fishbein MC, Adhikary L, et al. Influenza infection promotes macrophage traffic into arteries of mice that is prevented by D-4F, an apolipoprotein A-I mimetic peptide. *Circulation.* 2002;106(9):1127-32.

Semba RD, Cappola AR, Sun K, Bandinelli S, Dalal M, Crasto C, et al. Plasma klotho and cardiovascular disease in adults. *J Am Geriatr Soc.* 2011;59(9):1596-601.

Kanda E, Ai M, Okazaki M, Yoshida M, Maeda Y. Association of High-Density Lipoprotein Subclasses with Chronic Kidney Disease Progression, Atherosclerosis, and Klotho. *PLoS One.* 2016;11(11):e0166459.

Chapleau MW, Cunningham JT, Sullivan MJ, Wachtel RE, Abboud FM. Structural versus functional modulation of the arterial baroreflex. *Hypertension.* 1995;26(2):341-7.

Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest.* 1999;103(6):897-905.

Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1995;270(1):319-24.

Pelat M, Dessy C, Massion P, Desager JP, Feron O, Balligand JL. Rosuvastatin decreases caveolin-1 and improves nitric oxide-dependent heart rate and blood pressure variability in apolipoprotein E^{-/-} mice in vivo. *Circulation.* 2003;107(19):2480-6.