



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E EDUCAÇÃO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Renato de Oliveira

Neurotransmissão colinérgica na isquemia miocárdica aguda em ratos

Uberaba – MG

2015

RENATO DE OLIVEIRA

Neurotransmissão colinérgica na isquemia miocárdica aguda em ratos

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração I: Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

Uberaba – MG

2015

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

O51n Oliveira, Renato de
Neurotransmissão colinérgica na isquemia miocárdica aguda em ratos /
Renato de Oliveira. -- 2015.
79 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2015
Orientador: Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva

1. Infarto do miocárdio. 2. Coração - Doenças. 3. Mecanismos colinérgicos
4. Brometo de Piridostigmina. 5. Arritmias cardíacas. I. Silva, Valdo José
Dias da. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.127-005.8

Dedico essa dissertação de mestrado a minha esposa Andréia G.S. Oliveira pelo carinho, apoio e paciência e também aos meus pais Antônio (in memoriam) e Irani M. de Oliveira.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, sempre presente, por me oportunizar a vida, com saúde, alegria, coragem, determinação e persistência para vencer os desafios.

A meu orientador, o Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva por ter me ajudado a trilhar esse árduo caminho da pesquisa, por seus grandes ensinamentos, pela forte confiança e apoio nos momentos de dificuldade.

Aos professores da fisiologia Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues, Luiz Carlos dos Reis, Edson de Sousa Marques, Antônio Roberto Martins, Rosângela Soares e Simone Acrani, pelo convívio e companheirismo.

À aluna de pós-doutorado Vanessa Capuano pela parceria nas bancadas, pelo apoio técnico durante meu aprendizado das cirurgias e pelo companheirismo de sempre.

Aos companheiros de bancada, Camila, Gustavo, Lívia, Eduardo, Alessandra, Carolina Capitelli, Gleice, Rafael, Priscila, Thalles e a todos os colegas que dividiram o espaço no laboratório, pelo convívio em momentos difíceis e harmoniosos durante essa caminhada.

Aos funcionários e técnicos de Laboratório: Glauco, Donizete, Lucas, Angélica e Fausto pela amizade, dedicação e apoio diário.

À secretária da pós-graduação, Elizabeth Peres Caramori Ambrósio pela alegria e entusiasmo contagiante, pelos conselhos e conversas sempre produtivas.

Ao técnico do laboratório de histologia, João Nolberto de Oliveira pelo auxílio no registro fotográfico.

Ao técnico do laboratório de bioquímica, Geraldo Garcia pela amizade e prontidão em ajudar.

Aos professores Antônio Roberto Martins e Roseli Aparecida da Silva Gomes pelas valiosas contribuições em meu exame de qualificação.

À minha esposa Andréia, meu sogro Valdemar, minha sogra Cléa e meu cunhado Ailton que me apoiaram e ouviram minhas lamentações em momentos difíceis, mas também vivenciaram meu entusiasmo em cada descoberta.

Quero agradecer a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu conseguisse desenvolver esse trabalho.

“Não é o mais forte que sobrevive. Nem o mais inteligente. Mas o que melhor se adapta as mudanças”. Charles Darwin

OLIVEIRA, R. Neurotransmissão colinérgica na isquemia miocárdica aguda em ratos. [dissertação]. Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2015.

RESUMO

O infarto agudo do miocárdio constitui-se na principal causa de morte natural do mundo moderno, ceifando milhões de vidas anualmente em todo o mundo. Apesar dos inúmeros avanços na terapia nas últimas décadas, as arritmias cardíacas fatais na fase hiperaguda inicial do infarto ainda permanecem como uma importante causa de morte nestes pacientes. A busca por novas estratégias terapêuticas faz-se assim necessária. Uma vez que nesta fase hiperaguda, o desbalanço autonômico cardíaco contribui de forma importante para a patogênese das arritmias, estratégias terapêuticas voltadas para a modificação autonômica são justificáveis. No presente estudo, a potenciação da neurotransmissão colinérgica vagal cardíaca, induzida pelo agente anticolinesterásico, brometo de piridostigmina, foi investigada em ratos anestesiados com infarto agudo do miocárdio. Os animais tiveram os infartos induzidos pela oclusão do ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda, a qual provoca um infarto anterior-lateral extenso do ventrículo esquerdo, com inúmeras manifestações arrítmicas e elevada mortalidade aguda. O presente estudo demonstra pela primeira vez que a administração endovenosa em bolos repetidos do brometo de piridostigmina (na dose variando de 0,3mg/Kg a 0,6mg/Kg) promove proteção miocárdica, reduzindo significativamente a incidência de arritmias complexas com forte tendência de aumento da sobrevivência dos animais nas primeiras quatro horas de tratamento. Tais efeitos foram acompanhados de bradicardia sinusal leve a moderada, de início imediato e estável associado a leve hipotensão arterial sistêmica a partir da segunda hora de tratamento. O tratamento não modificou a extensão da área infartada, quantificada via perfusão ex vivo do coração inteiro com o corante azul de Evans ou incubação de fatias miocárdicas com o cloreto

de Trifenil tetrazólio. Ainda que os possíveis mecanismos moleculares deste efeito não tenham sido explorados neste trabalho, tais resultados confirmam e ampliam dados anteriores da literatura, abrindo uma enorme perspectiva de possível uso clínico futuro deste fármaco como terapia adjuvante no tratamento do infarto agudo miocárdico em seres humanos.

Palavras-chave: infarto agudo do miocárdio, estimulação colinérgica, brometo de piridostigmina, proteção miocárdica, arritmias cardíacas.

OLIVEIRA, R. Neurotransmissão colinérgica na isquemia miocárdica aguda em ratos. Cholinergic neurotransmission in acute myocardial ischemia in rats [dissertation]. Uberaba (BR): Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2015.

ABSTRACT

Acute myocardial infarction is the major natural death cause in the world, killing millions of people every year. Despite of several major therapeutic advances in the last few decades, the life-threatening cardiac arrhythmias in initial hyper-acute phase of myocardial infarction remains as an important cause of death in infarcted patients. Therefore, the intensive search for new therapeutic strategies is still necessary. Since in this hyper-acute phase of myocardial infarction, cardiac autonomic imbalance contributes to the pathogenesis of cardiac arrhythmias, new therapeutic strategies based on autonomic modifications seems to be justifiable. In the present study, cardiac vagal cholinergic neurotransmission potentiation induced by an anti-cholinesterasic agent, pyridostigmine bromide, was investigated in anesthetized rats with myocardial infarction, which was induced via occlusion of anterior descendent left coronary artery. This occlusion provokes an extensive anterior-lateral myocardial infarction associated with several life-threatening ventricular arrhythmias and elevated mortality. The present study demonstrates for the first time that endovenous injection of repeated bolus of pyridostigmine bromide (at doses varying from 0,3mg/Kg to 0,6mg/Kg) promotes myocardial protection, significantly reducing the score of complex ventricular arrhythmias, with a major trend to prolong survival rate in the animals during the first four hours of myocardial infarction. These effects were accompanied with an immediate mild to moderate sinusal bradycardia associated with mild systemic arterial hypotension after two hours of treatment. The pyridostigmine bromide treatment did not change the size of myocardial infarction, quantified via *ex vivo* perfusion of whole heart with Evans'blue stain or in myocardial slices incubated with triphenyltetrazolium chloride. Even though the possible

molecular mechanisms of these effects have not been explored in the present study, these results confirm and widen previous data, opening a huge perspective of a future possible clinical use of pyridostigmine bromide as an adjuvant therapy in the treatment of acute myocardial infarction in human beings.

Keywords: acute myocardial infarction, cholinergic stimulation, pyridostigmine bromide, myocardial protection, cardiac arrhythmias.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Traçado dos sinais de pressão arterial (PA), CO₂ corrente e eletrocardiograma nas derivações precordiais V1 a V6 de um animal representativo do grupo infartado tratado com salina em diferentes tempos ao longo dos primeiros 5 minutos de indução do IAM.....48
- Figura 2:** Valores médios (\pm erro padrão) das alterações em relação ao basal da frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), CO₂ corrente (CO₂c) e frequência respiratória (FR) dos grupos sham tratado com salina (Sham-Sal) ou com brometo de piridostigmina (Sham-Pir) ao longo do protocolo experimental.....50
- Figura 3:** Valores médios (\pm erro padrão) das alterações em relação ao basal da frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), CO₂ corrente (CO₂c) e frequência respiratória (FR) dos grupos de animais infartados tratado com salina (Inf-Sal) ou com brometo de piridostigmina (Inf-Pir) ao longo do protocolo experimental.....52
- Figura 4:** Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para os grupos de animais infartados tratado com salina (Inf-Sal) ou com brometo de piridostigmina (Inf-Pir) ao longo das quatro horas de observação. Note o valor de $p=0,081$ avaliado pelo teste-F de Cox.....53
- Figura 5:** Extrassístoles ventriculares (ESVs). Traçados dos sinais de pressão arterial (PA), CO₂ corrente e eletrocardiograma nas derivações precordiais V1 a V6 de um animal representativo do grupo infartado tratado com salina (Inf-Sal) no período basal (à esquerda) e depois de 10 minutos do IAM (à direita), mostrando algumas extrassístoles ventriculares, indicadas por setas.....55

Figura 6: (Painel A): frequência de ocorrência das ESVs (em ESVs/100.000 batimentos) nos dois grupos infartados. (Painel B): Curva de Kaplan-Meier do percentual de animais sem ESVs ao longo das quatro horas.....56

Figura 7: Traçado dos sinais de pressão arterial (PA), CO2 corrente e eletrocardiograma nas derivações precordiais V1 a V6 de um animal representativo do grupo infartado tratado com salina (Inf-Sal) evidenciando um curto período de taquicardia ventricular (*), “Torsades de Pointes” (**) e flutter ventricular (***).....57

Figura 8: (Painel A): Episódios de taquicardia/flutter ventriculares (número/hora). (Painel B): Duração total de taquicardia/flutter ventriculares (em segundos). (Painel C): Duração média de taquicardia/flutter ventriculares (em segundos). (Painel D): Curvas de Kaplan-Meier do percentual de animais sem taquicardia/flutter ventriculares ao longo das quatro horas.....58

Figura 9: Traçado dos sinais de pressão arterial (PA), CO2 corrente e eletrocardiograma nas derivações precordiais V1 a V6 de um animal representativo do grupo infartado tratado com salina (Inf-Sal) evidenciando um período prolongado de fibrilação ventricular, o qual provocou o óbito do animal.....59

Figura 10: (Painel A): Valores médios (\pm EPM) da duração total de fibrilação ventricular (em segundos). (Painel B): e da duração média de fibrilação ventricular (em segundos). * $p < 0,05$ versus grupo Inf-Sal.....60

Figura 11: Traçado dos sinais de pressão arterial (PA), CO2 corrente e eletrocardiograma nas derivações precordiais V1 a V6 de um animal representativo do grupo infartado tratado com salina (Inf-Sal) evidenciando um período de bradicardia por bloqueio átrio-ventricular do segundo grau, logo após a reversão espontânea de uma fibrilação ventricular.....62

Figura 12: Valores médios (\pm EPM) da duração total de bradicardia (em segundos) (Painel A) e da duração média de bradicardia (em segundos) (Painel B).....63

Figura 13: Valores médios (\pm erro padrão) da pontuação total de arritmias cardíacas nos grupos Inf-sal e Inf-Pir. ($p < 0,05$ versus Inf-Sal).....64

Figura 14: (Painel A): Cortes de coração infartado incubados com TTC a fim de quantificar o tamanho da área cardíaca infartada (coloração pálida) em relação ao miocárdio não-infartado (coloração avermelhada pela impregnação do TTC) nos animais tratados com brometo de piridostigmina ou salina. (Painel B): Tamanho do infarto (em % do perímetro cardíaco). (Painel C): Transmuralidade.....65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios (\pm erro padrão) de frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), concentração de CO ₂ no volume respiratório corrente (CO ₂ c) e frequência respiratória (FR) nos quatro grupos experimentais medidos nos primeiros 20 minutos antes (período basal) e após os primeiros 5 minutos de infarto agudo do miocárdio (IAM), induzido por ligadura da artéria coronária descendente anterior.....	46
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach	acetilcolina
Akt	proteína quinase de treonina/ serina
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
ATP	adenosina trifosfato
AV	átrio ventricular
bpm	batimentos por minuto
CK	creatina fosfoquinase
CK MB	creatina fosfoquinase fração MB
CO ₂	gás carbônico
CO _{2c}	gás carbônico corrente
Cx43	conexina 43
DCV	doenças cardiovasculares
ECG	eletrocardiograma
ESV(s)	extrassístole(s) ventricular(s)
FC	frequência cardíaca
FR	frequência respiratória
FV	fibrilação ventricular
g	gramas
Gi	nucleotídeo guanina
GTP	guanosina trifosfato
h	hora
Hz	hertz
i.p	intraperitoneal
IP3-k	fosfatidilinositol -3 quinase
i.v	intravenoso
IAM	infarto agudo do miocárdio
IAM ST	infarto do miocárdio com elevação do segmento ST
IAMS ST	infarto do miocárdio sem elevação do segmento ST
IC	insuficiência cardíaca
ICC	insuficiência cardíaca congestiva
IL	interleucina
Inf-Pir	animais infartados que receberam brometo de piridostigmina
Inf-Sal	animais do grupo infartado que recebeu salina
K+	potássio
Kg	quilograma
LDL	lipoproteína de alta densidade
mg	miligrama
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
mm Hg	milímetros de mercúrio
MMP	matriz de metaloproteinases
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
PA	pressão arterial
PAM	pressão arterial média
pH	potencial hidrogeniônico

PKA	proteína quinase A
PKB	proteína quinase B
PKC	proteína quinase C
PTP	poro de transição de permeabilidade
resp	respirações
rpm	respirações por minuto
SCA	síndrome coronariana aguda
SCAS ST	síndrome coronariana aguda sem supradesnivelamento do segmento ST
TGF β	fator transformador de crescimento (beta)
TNF α	fator de necrose tumoral (alfa)
TTC	cloreto de trifenil tetrazolium
TV	taquicardia ventricular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	17
1.2 DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA	18
1.3 INFARTO DO MIOCÁRDIO	21
1.3.1 Fatores de risco	24
1.3.2 Infarto agudo do miocárdio e controle autonômico cardiovascular	25
1.3.3 Arritmias	27
1.4 ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA	29
2. OBJETIVOS	36
2.1 OBJETIVO GERAL	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	37
3.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	37
3.2.1 Preparação para indução do Infarto Agudo do Miocárdio	37
3.2.2 Canulação dos vasos femorais	39
3.3 ESTUDO ELETROCARDIOGRÁFICO	39
3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	40
3.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS	41
3.6 ANÁLISE DE DADOS	41
3.6.1 Arritmias cardíacas	42
3.6.2 Pontuação das arritmias cardíacas	43
3.7 AVALIAÇÃO DO TAMANHO DO INFARTO	44
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
4. RESULTADOS	46
4.1. PARÂMETROS BASAIS INICIAIS	46
4.2. ADMINISTRAÇÃO DE BROMETO DE PIRIDOSTIGMINA NOS ANIMAIS CONTROLES NÃO-INFARTADOS (SHAM)	47
4.3. ADMINISTRAÇÃO DE BROMETO DE PIRIDOSTIGMINA NOS ANIMAIS INFARTADOS (INF)	49
4.3.1. Parâmetros Hemodinâmicos, Autonômicos e Respiratórios	49
4.3.2. Taxa de Sobrevida	51
4.3.3. Arritmias Cardíacas	54
4.3.4. Tamanho do Infarto Agudo do Miocárdio	64
5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Nas últimas décadas, as doenças cardiovasculares (DCV) se tornaram o grande problema da saúde, visto que representam a principal causa de mortalidade e morbidade nos países industrializados. Atualmente, essas doenças são responsáveis por aproximadamente 30% das mortes no mundo. Estima-se que para o ano de 2030, em torno de 33% de todas as mortes será resultado das doenças cardiovasculares, quando a estimativa da população gira em torno de 8,2 bilhões de pessoas (Gaziano, 2008). No Brasil, as doenças cardiovasculares constituem a principal causa de morte em todas as regiões do país, em ambos os sexos e são responsáveis por quase 32% de todos os óbitos (Brasil, 2011).

Dentre as doenças cardiovasculares, o infarto agudo do miocárdio (IAM) é a principal causa de mortalidade. Em 2011, dados do Ministério da Saúde apontam que a mortalidade média por infarto agudo do miocárdio no serviço público no Brasil estava em torno de 15%, bem acima da média dos países mais avançados da Europa. Nesse mesmo ano, os infartos mataram mais de 82 mil brasileiros (Brasil, 2011).

Um recente ensaio clínico na Europa aponta uma taxa de mortalidade de 8,4% no primeiro mês para pacientes apresentando síndrome coronária aguda com elevação do segmento ST. (Van de Werf et al., 2003).

A fase aguda do infarto do miocárdio é a fase mais preocupante e requer maior atenção dos profissionais da saúde. Embora, uma parcela das mortes por IAM aconteça fora do ambiente hospitalar, haja vista que 40 a 60% das mortes ocorre nas primeiras horas e quase 80% nas primeiras 24 horas (Piegas et al., 2009), exige-se dos profissionais da saúde uma

conduta rápida e diagnóstico preciso para o paciente que chega ao serviço de pronto atendimento com queixa de dor torácica.

Todavia, os pacientes admitidos precocemente nos serviços de urgência e emergência foram os que mais se beneficiaram dos avanços terapêuticos das últimas décadas. A mortalidade intra-hospitalar que era cerca de 30% até 1960 e 18% na era pré-fibrinolítica em 1980 caiu para aproximadamente 8% nos primeiros 30 dias após o infarto, com o uso da aspirina, desenvolvimento dos fibrinolíticos e intervenções coronárias, tais como a angioplastia primária, que permitem a revascularização (Van de Werf et al., 2003).

Apesar desses avanços terapêuticos, para que seja diminuída a morbidade e mortalidade da doença coronária, há a necessidade não só de identificação e controle dos fatores de risco, como também de se investir em novas estratégias efetivas de prevenção e de se desenvolver novas terapias para a fase aguda da oclusão coronariana que diminuam as arritmias e limitem a extensão do infarto em evolução.

1.2 DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

A doença arterial coronariana (DAC) caracteriza-se pela insuficiente irrigação sanguínea ao coração através das artérias coronárias. Está diretamente relacionada ao grau de obstrução ao fluxo sanguíneo pelas placas ateroscleróticas, causando um estreitamento das artérias coronárias (estenose), o que diminui o aporte de oxigênio ao coração devido à redução do fluxo sanguíneo coronariano (Pinho et al., 2010).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica e progressiva mediada basicamente por macrófagos derivados de monócitos e alguns subtipos de linfócitos T. Ocorre principalmente nas artérias de grande e médio porte (aorta, carótidas, ilíacas), incluindo as coronárias. A aterosclerose se desenvolve a partir da disfunção endotelial geralmente causada

pela combinação de alguns fatores, tais como: elevada concentração sanguínea de lipoproteína de alta densidade (LDL) colesterol e homocisteína; hipertensão; diabetes; radicais livres causados por fumo; alterações genéticas; infecções por microrganismos tais como Herpes vírus e Clamídia (Ross, 1999).

A disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da camada íntima às lipoproteínas plasmáticas favorecendo a retenção das mesmas no espaço subendotelial. Retidas, as partículas de LDL sofrem oxidação. O depósito de lipoproteínas na parede arterial é processo-chave no início da aterogênese, ocorre de maneira proporcional à concentração dessas lipoproteínas no plasma.

Além do aumento da permeabilidade às lipoproteínas, outra manifestação da disfunção endotelial é o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial, processo estimulado pela presença de LDL oxidada. As moléculas de adesão são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a parede arterial. Induzidos por proteínas quimiotáticas, os monócitos migram para o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos, que por sua vez captam as LDL oxidadas. Os macrófagos repletos de lipídios são chamados células espumosas e são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose. Alguns mediadores da inflamação estimulam a migração e proliferação das células musculares lisas da camada média arterial. Estas, ao migrarem para a camada íntima, passam a produzir não só citocinas e fatores de crescimento, como também matriz extracelular rica em colágeno que formará parte da capa fibrosa da placa aterosclerótica (Ross, 1999).

A placa aterosclerótica plenamente desenvolvida é constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular e núcleo lipídico. Estes elementos formam na placa aterosclerótica, o núcleo lipídico, rico em colesterol e a capa fibrosa, rica em colágeno. As placas estáveis caracterizam-se por predomínio de colágeno, organizado em capa fibrosa

espessa, escassas células inflamatórias e núcleo lipídico de proporções menores. As instáveis apresentam atividade inflamatória intensa, especialmente nas suas bordas laterais, com grande atividade proteolítica, núcleo lipídico proeminente e capa fibrosa tênue. A ruptura desta capa expõe material lipídico altamente trombogênico, levando à formação de um trombo sobrejacente. Essas mudanças podem estar acompanhadas pela produção de fatores teciduais pró-coagulantes aumentando a possibilidade de formação de trombose mural com oclusão parcial ou total do vaso (Ross, 1999).

Pensava-se anteriormente que o estreitamento luminal progressivo pelo crescimento contínuo de células de músculo liso na placa era a principal causa de infarto. Estudos angiográficos, entretanto, identificaram que a ruptura da placa em vez de estenose, precipita isquemia e infarto. Espasmo coronariano pode estar envolvido até certo ponto, mas a maioria dos casos de infarto é devido à ruptura súbita e formação de trombo oclusivo na superfície de placas vulneráveis, inflamadas, ricas em lipídios e com capa fibrosa delgada (Hansson, 2005).

A isquemia miocárdica é a causa das síndromes coronárias agudas (SCA) que se manifestam clinicamente por sinais e sintomas típicos como dor torácica constritiva e intensa, diaforese, arritmias ventriculares, insuficiência cardíaca ou choque cardiogênico. O principal evento resultante da isquemia é o infarto agudo do miocárdio (IAM). Contudo, a primeira manifestação da SCA pode ser a morte súbita ou a angina instável (Ruff e Braunwald, 2011).

O termo síndrome coronária aguda (SCA) tem envolvido um leque de diagnósticos para capturar o largo espectro de severidade da doença e manifestações clínicas multiformes da aterosclerose coronária, que vai da angina instável e infarto do miocárdio sem elevação do segmento ST, ambas englobadas dentro da síndrome coronariana aguda sem supradesnível de segmento ST (SCASST) e infarto do miocárdio com elevação do segmento ST (IAMST). O diagnóstico da SCA e a diferenciação entre seus componentes dependem da presença de

sintomas clínicos, critérios eletrocardiográficos e avaliação dos biomarcadores de lesão miocárdica (Ruff e Braunwald, 2011).

A dor precordial conhecida como angina é a manifestação clínica predominante e esta pode ocorrer também na ausência de DAC obstrutiva, como na presença de Estenose Aórtica, Cardiomiopatia Hipertrófica ou Cardiomiopatia Dilatada Idiopática (Zipes et al., 2005).

Existem três tipos de angina. A angina estável é caracterizada pelo surgimento da dor sempre que há aumento da demanda de oxigênio pelo coração como no esforço físico, estresse emocional ou hiperatividade simpática, sendo que, a dor geralmente desaparece com o repouso e/ou com o uso de vasodilatadores coronarianos. A angina variante de Prinzmetal, que é a dor precordial atribuída ao vasoespasma coronariano, tipicamente ocorre em repouso e responde à administração de bloqueadores dos canais de cálcio e vasodilatadores coronarianos. Por último, a angina instável, é a dor precordial que surge cada vez mais intensa e com intervalo cada vez menor. Pode ocorrer em repouso e não está necessariamente relacionada com o aumento do trabalho cardíaco. A angina instável, na maioria dos pacientes, ocorre por fissura ou ruptura da placa aterosclerótica com trombose e diminuição do fluxo coronário (Ruff e Braunwald, 2011).

O diagnóstico de angina instável é puramente clínico, feito com base na “história do paciente” de isquemia miocárdica instável, sem evidências bioquímicas ou eletrocardiográficas de isquemia ou infarto. Estudos indicam que cerca de 20% dos pacientes inicialmente diagnosticados como tendo angina instável que foram encaminhados para angiografia, não tinham nenhuma DAC relevante (Ruff e Braunwald, 2011).

1.3 INFARTO DO MIOCÁRDIO

O Infarto agudo do miocárdio (IAM) é definido como a necrose do músculo cardíaco causada por isquemia prolongada resultante da baixa perfusão tecidual devido à oclusão da

artéria coronária. Em geral, essa isquemia é causada por trombose e/ou vasoespasmos sobre uma placa aterosclerótica (Pesaro, Serrano e Nicolau, 2004).

Necrose ocorre quando cardiomiócitos sofrem privação de oxigênio ou energia, com perda da integridade da membrana celular, influxo de líquido extracelular, edema do miócito e liberação de enzimas proteolíticas que levam a disrupção celular (Pontes e Leães, 2004).

No entanto, já está descrito que no miocárdio isquêmico as células morrem tanto por necrose quanto por apoptose, sendo que nas primeiras 24h após o infarto, a apoptose é a principal forma de morte celular observada (Zhao et al., 2000). Na apoptose (morte celular programada) de cardiomiócitos, um programa genético específico ativa uma cascata molecular, com ativação das caspases levando a degradação do DNA nuclear e posterior digestão pelas células vizinhas, sem reação inflamatória (Pontes e Leães, 2004).

A elevada taxa de apoptose no início da lesão isquêmica ocorre devido a alterações na expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas, com uma redução na razão Bcl2/Bax, um marcador de viabilidade celular. Assim, enquanto a proteína Bax pró-apoptótica aumenta, a proteína Bcl2 anti-apoptótica diminui (Zhao et al., 2000; Simonis et al., 2008; Mill et al., 2011).

A Organização Mundial da Saúde define IAM pela presença de pelo menos dois entre os aspectos: quadro clínico, alterações eletrocardiográficas e marcadores bioquímicos de necrose. No quadro clínico, a apresentação típica é caracterizada por dor precordial em aperto ou peso, podendo se irradiar para a região cervical e/ou membro superior esquerdo, vem com grande intensidade e prolongada, com mais de 20 minutos, resistente ao repouso ou ao uso de nitrato sublingual. Náuseas, vômitos, dispnéia, palidez e fraqueza podem ocorrer como sintomas associados, porém são inespecíficos. Em alguns casos, pode ser assintomático ou com quadro clínico atípico, principalmente em pacientes diabéticos (Pesaro, Serrano e Nicolau, 2004).

As alterações eletrocardiográficas são muito importantes no diagnóstico do IAM, visto que os sintomas são extremamente variados e que a elevação dos marcadores inicia-se 6 horas após o início da dor. O eletrocardiograma deve ser feito seriadamente nas primeiras 24 horas e diariamente após o primeiro dia (Pesaro, Serrano e Nicolau, 2004). O supra desnivelamento do segmento ST > 1 mm em duas derivações adjacentes determina o diagnóstico e correlaciona-se com a topografia do infarto (Zimetbaum e Josephson, 2003) Por exemplo: supra desnivelamento em V1, V2, V3 relaciona-se com parede ântero-septal, em D1 e aVL com parede lateral alta, em V1 a V6, anterior extensa, em D2, D3 e aVF com inferior e finalmente V7 e V8 com parede posterior.

Os primeiros marcadores usados para o diagnóstico do infarto do miocárdio tais como a transaminase oxalacética glutâmica e a desidrogenase láctica, têm sido substituídos pela creatina fosfoquinase (CK), creatina fosfoquinase fração MB (CK-MB), marcador de necrose miocárdica com elevação de 6 a 8 h após o início dos sintomas, com pico em 24 horas e normaliza-se em quatro dias. Mais recentemente, outro marcador bastante utilizado é a troponina cardíaca específica T ou I. Suas medidas se elevam geralmente após 6 horas do início do quadro, permanecendo elevadas por uma semana (Ruff e Braunwald, 2011). No ano 2000, foi recomendado pela European Society of Cardiology e o American College of Cardiology que o nível de troponina fosse incorporado à nova definição de Infarto agudo do miocárdio devido ao maior valor prognóstico comparado com CK e CK-MB. Essa mudança tornou-se uma definição universal do Infarto do Miocárdio em 2007 (Tygensen, Alpert e White, 2007).

Após a obstrução da artéria coronária, a necrose muscular é acompanhada por um processo inflamatório. Observa-se um infiltrado celular inflamatório composto inicialmente de neutrófilos e posteriormente de linfócitos e monócitos. São produzidas interleucinas IL-6, IL-1 β e o fator de necrose tumoral (TNF- α) observados precocemente no tecido isquêmico,

podendo ser detectados já com 3 horas após a oclusão coronariana (Deten et. al., 2002; Vandervelde et. al., 2007).

Com o processo inflamatório, neutrófilos liberam metaloproteinases (MMP), uma grande família de enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação do colágeno, evidenciadas 1 hora após o infarto. A ação das collagenases MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9 estão aumentadas durante a fase necrótica de cicatrização do infarto. Estudo prévio sugere que três horas após a oclusão coronariana, 50% do colágeno já tenha sido degradado e essa atividade proteolítica termina uma semana após o infarto. (Holmes, Borg e Corvell, 2005). Com 24 horas, a necrose muscular torna-se evidente acompanhada por um infiltrado inflamatório. Macrófagos consomem o tecido necrótico e liberam citocinas que estimulam a produção de fibroblastos. Após três dias da oclusão coronariana, inicia-se o acúmulo de miofibroblastos. O tecido necrótico vai sendo substituído por tecido fibroso com a síntese de colágeno novo. Acredita-se que os miofibroblastos são fibroblastos com actina em sua composição e foram modificados pelo TGF- β secretado pelos monócitos. Os miofibroblastos têm a função de sintetizar colágeno I e III, que começa a acumular-se na região periférica do infarto no terceiro dia e torna-se bem organizado 14 dias após o IAM. A cicatrização estará completa com 21 dias da oclusão coronariana (Ertl e Frantz, 2005).

1.3.1 Fatores de risco

Os achados de um estudo de caso-controle denominado AFIRMAR, desenvolvido em 104 hospitais de 51 cidades do Brasil, confirmam a importância dos fatores de risco tradicionais (tabagismo, hipertensão arterial, diabetes mellitus, obesidade, dislipidemia, historia familiar) na associação com o infarto agudo do miocárdio (Piegas et al., 2003).

O estudo INTERHEART foi um estudo de caso-controle internacional, delineado para avaliar de forma sistematizada a importância de fatores de risco para doença arterial

coronariana ao redor do mundo. Foram 262 centros em 52 países dos 5 continentes, onde pacientes com infarto agudo do miocárdio (IAM) nas primeiras 24 horas foram pareados (idade e sexo) para controles hospitalares e comunitários. Nesta avaliação, nove fatores de risco explicaram mais de 90% do risco atribuível para IAM. De modo surpreendente tabagismo e dislipidemia (aferida pela relação ApoB/ApoA1) compreenderam mais de dois terços deste risco. Fatores psicossociais, obesidade central, diabetes, hipertensão foram também significativamente associados, embora com algumas diferenças relativas nas diferentes regiões estudadas (Yusuf et al., 2004). Lanas e colaboradores (2007) descreveram a associação do tabagismo, da dislipidemia, da hipertensão, do diabetes, da obesidade abdominal, do estresse, da falta de consumo diário de frutas e verduras e da falta de prática de exercícios físicos com o risco de desenvolvimento do infarto cardíaco.

1.3.2 Infarto agudo do miocárdio e controle autonômico cardiovascular

O sistema nervoso autônomo desenvolve papel fundamental na manutenção da frequência e do ritmo cardíaco normal fornecendo nervos eferentes ao coração, na forma de terminações simpáticas por todo o miocárdio e parassimpáticas para o nódulo sinusal, miocárdio atrial e nódulo atrioventricular. O controle cardiovascular é afetado pelo equilíbrio entre o simpático e parassimpático (nervo vago), os quais exercem uma ação regulatória, controlando vários parâmetros, como a frequência cardíaca, a pressão arterial e a resistência periférica, por meio de mecanismos reflexos, isto é, o aumento da FC é uma consequência da maior ação da sinalização simpática e da menor atividade parassimpática, ou seja, inibição vagal, enquanto que a redução da FC depende basicamente do predomínio da atividade vagal (Aubert, Seps e Beckers, 2003).

O infarto agudo do miocárdio é frequentemente relacionado com aumento da atividade simpática. Os níveis de catecolaminas plasmáticas aumentam significativamente poucos minutos após a oclusão coronariana em modelos experimentais. Ocorre aumento da frequência cardíaca após o IAM e decréscimo da variabilidade da frequência cardíaca nos primeiros dias após o IAM, considerada um marcador do comprometimento da atividade vagal cardíaca (Casolo et al., 1992). Portanto, o IAM está acompanhado por desequilíbrio da atividade do sistema nervoso autonômico, o qual é caracterizado pela ativação do sistema nervoso simpático e a inativação do sistema nervoso parassimpático (Graham et al., 2002). Todavia, observa-se em um pequeno percentual de pacientes com infarto da parede diafragmática ou inferior do coração, no qual pela ativação de aferentes cardíacos amielínicos, uma ativação vagal parassimpática moderada a intensa, acompanhada de grave bradicardia vagal (Goldstein et al., 2005).

No início da lesão miocárdica, a ativação de mecanismos compensatórios tais como o simpatoadrenal e o sistema renina-angiotensina-aldosterona tendem a compensar a deterioração da função de bombeamento (Li et al., 2004). A ativação aguda do sistema nervoso autônomo com aumento do tônus simpático constitui um mecanismo adaptativo, envolvendo efeitos inotrópicos e cronotrópicos, para a restauração ou manutenção do débito cardíaco, da pressão arterial e da perfusão dos órgãos em situações onde o aporte sanguíneo está comprometido (Eisenhofer et al., 1996). No entanto, a persistência da hiperativação simpática acarreta efeitos deletérios. Evidências clínicas sobre o tônus e reflexo autonômico após o infarto do miocárdio sugerem que a atividade vagal diminuída e a elevada frequência cardíaca estão associadas a uma alta taxa de mortalidade na insuficiência cardíaca (La Rovere et al., 2001). Os altos níveis de adrenalina no coração após o IAM aumentam o risco de arritmias e morte súbita (Casolo et al., 1992). Várias linhas de pesquisa também relacionam a

hiperativação do sistema simpático nos pacientes como a maior contribuição para o remodelamento cardíaco (Zipes e Rubart, 2006; Kobayashi et al., 2013).

Após a isquemia ocorre redução funcional do miocárdio ventricular acarretando uma sobrecarga de trabalho ao miocárdio normal remanescente levando a aumentos na tensão transmural sistólica e particularmente diastólica, com conseqüente estímulo para a hipertrofia do miocárdio remanescente, o que caracteriza o remodelamento ventricular (Pfeffer et al., 1979). O remodelamento ventricular progressivo pode se desenvolver levando a aumentos no volume sistólico final, pressão e volume diastólico final do ventrículo esquerdo, diminuição da fração de ejeção e débito cardíaco, culminando com insuficiência cardíaca congestiva (Pfeffer et al., 1991). Em adição ao estímulo mecânico primário, aumentos progressivos na atividade do sistema renina-angiotensina e na atividade simpática (Meredith et al., 1993) podem aumentar ainda mais a tensão transmural causando efeitos adversos sobre o coração, acelerando o remodelamento cardíaco e o aparecimento de insuficiência cardíaca (IC).

1.3.3 Arritmias

O desequilíbrio do balanço simpatovagal cardíaco que surge com o desenvolvimento da isquemia coronária, levando a hiperatividade simpática e atenuação da atividade parassimpática, favorece o aparecimento de arritmias espontâneas (Casolo et al., 1992). Os efeitos excitatórios simpáticos podem ser fatores de instabilidade eletrofisiológica pró-arritmogênicos, enquanto que os efeitos parassimpáticos conferem certa estabilidade eletrofisiológica ao coração e são fatores anti-arritmogênicos (Taggart et al., 2003). Sabe-se que a maioria das mortes precoces é causada por arritmias ventriculares complexas, particularmente a taquicardia ventricular (TV) e a fibrilação ventricular (FV). (Northover, 1982).

Optiz et al. 1995, obtiveram dados eletrocardiográficos contínuos em ratos conscientes após a oclusão coronariana por até 48 horas após o infarto pelo uso de sistemas telemétricos em miniatura, os quais permitem um registro contínuo do eletrocardiograma (ECG) por períodos mais longos em animais não conectados a cabos de registro. Com base nestes estudos em animais acordados, dois períodos arritmogênicos distintos foram evidenciados em ratos com IAM: um período precoce correspondente à primeira meia hora da ligadura e um período mais tardio compreendido entre a primeira hora e meia até nove horas após a ligadura. Cada um destes dois períodos foi seguido por um período quiescente de baixa atividade arritmica: entre 30 minutos e 1,5 horas e de 10 a 48 horas após a ligadura. Uma taxa de mortalidade total de 65% foi encontrada dentro dos dois períodos arritmicos com a maioria das mortes ocorrendo no segundo período. Ratos com os maiores infartos e aqueles que evoluíram para óbito dentro das primeiras 48 horas apresentaram uma maior frequência e duração dos episódios de arritmias.

No primeiro período, onde a necrose miocárdica ainda não se completou, muito provavelmente o aumento de potássio extracelular, aumento da concentração de cálcio intracelular, mudanças neuro-humorais e a queda do pH levam a um retardo de condução do potencial de ação com aumento na probabilidade de formação de circuitos de reentrada na zona isquêmica (Kaplinsky et al. 1979; Ando et al. 2005). Já o segundo período, que corresponde ao desenvolvimento máximo da necrose miocárdica, muito provavelmente está associado à presença de miócitos despolarizados com automatismo anormal, localizados na zona de transição entre o miocárdio necrótico e o miocárdio isquêmico ainda viável (Wit e Janse, 1993).

1.4 ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA

Atualmente, torna-se muito interessante a busca por drogas que possam conferir ação cardioprotetora para a utilização em pacientes portadores de cardiopatias isquêmicas. Alguns trabalhos mostraram que a estimulação colinérgica possibilita aumento da resposta vagal em pacientes após infarto agudo do miocárdio, onde conhecidamente existe uma diminuição da atividade parassimpática (Androne et al., 2003; De Ferrari et al., 2011).

A acetilcolina (ACh) é o principal mediador químico do ramo parassimpático do SNA, é sintetizada no citosol do nervo terminal, a partir da ação da enzima colina acetiltransferase que converte a colina livre e acetil-coA em acetilcolina, que é então estocada em vesículas e liberada através de estimulação vagal, atuando sobre receptores pós-sinápticos muscarínicos. Os efeitos terminam pela rápida degradação da acetilcolina pelas acetilcolinesterases (Vasegui e Shivkumar, 2008). A acetilcolina se liga a receptores muscarínicos do miocárdio, predominantemente do tipo M₂. Alguns estudos também apontam outros subtipos tais como M₁, M₃, M₄ e M₅ presentes no coração de diferentes mamíferos, incluindo humanos (Wang et al., 2001).

A sinalização colinérgica leva a uma diminuição da frequência cardíaca, das forças contráteis dos átrios e da velocidade de condução de ambos os nós sinoatrial e atrioventricular. Os efeitos cronotrópicos e inotrópicos negativos são mediados pela ligação da acetilcolina ao receptor muscarínico M₂, já que a ativação dos receptores M₂ é acoplada a proteína G, através da via inibitória Gi, causando inibição da enzima adenilato ciclase, com consequente redução na produção de AMPc, supressão de canais de Ca⁺² voltagem-dependentes e ativação de canais de K⁺ operados por receptores, sendo o aumento da condutância ao potássio responsável pelos efeitos cronotrópicos e inotrópicos. No entanto, nos tecidos atrial e nodal, a atuação dos receptores M₂ ativa outra proteína G, a Gk, o que

provoca um aumento direto do efluxo de K^+ pela abertura dos canais de K^+ , independente dos sistemas de segundo mensageiro (Caulfield e Birdsall, 1998). Devido a este acoplamento direto, não enzimático e independente de AMPc na via de ativação parassimpática, em comparação com a ativação simpática, o coração responde mais rapidamente ao estímulo pelo ramo parassimpático, e a influência do sistema parassimpático também pode acabar muito mais rapidamente. Isto, em particular, é porque, ao contrário da adrenalina, que é altamente conservada e é recaptada pelos neurônios após a liberação, a acetilcolina é rapidamente hidrolisada pela acetilcolinesterase e não existe um transportador de acetilcolina, uma vez que só colina é levada de volta para dentro do neurônio para ser reutilizada em nova síntese de acetilcolina pela colina acetiltransferase (Vasegui e Shivkumar, 2008).

Sabe-se que a estimulação vagal é capaz de proteger contra episódios de fibrilação ventricular, enquanto que a disfunção autonômica está associada a graves arritmias ventriculares (Waxman et al., 1988). Assim, é possível que a estimulação elétrica vagal direta ou drogas de ação parassimpaticomimética possam conferir cardioproteção.

Estudos mostraram que a estimulação elétrica vagal em pacientes com insuficiência cardíaca crônica, com grave disfunção sistólica, pode melhorar a função ventricular esquerda, melhorando a qualidade de vida do paciente (De Ferrari et al., 2011).

Em ratos, a estimulação elétrica do nervo vago, 14 dias após o infarto e durante seis semanas, provocou a redução da frequência cardíaca, melhorou a eficiência do coração, e exerceu função protetora diminuindo o remodelamento do ventrículo esquerdo em longo prazo e aumentando a sobrevivência dos animais (Li et al., 2004).

A estimulação vagal aplicada durante a isquemia miocárdica aguda em ratos protegeu contra arritmias ventriculares. A estimulação vagal preservou a forma fosforilada da conexina 43 (Cx43), o principal subtipo de proteína das junções *gap* nos ventrículos. A preservação da conexina 43 manteve o acoplamento elétrico, fundamental na manutenção da estabilidade

elétrica, evitando a heterogeneidade de repolarização e retardo na condução, que ocorrem durante a isquemia (Ando et al., 2005).

A serina/treonina quinase Akt ou proteína quinase B (PKB) é um importante mediador de várias ações metabólicas da insulina, atua no crescimento celular, mas a maior atividade da Akt/ PKB é mediar a sobrevivência celular. A Akt tem efeito direto na via da apoptose celular, ligando-se a proteína pró-apoptótica Bad. A proteína Bad se liga a Bcl-2 e Bcl-x inibindo o efeito anti-apoptótico destas proteínas. No entanto, quando a Akt se liga a Bad, ocorre fosforilação do resíduo Ser 136, inativando a proteína Bad. Sendo Bad liberado do complexo formado pelo Bcl-2 e Bcl-x, essas proteínas ficarão livres para desempenhar melhor sua função anti-apoptótica. O Bcl-2 é um conservador da mitocôndria e impede que o citocromo c seja a liberado (Orcy et al., 2008). A Akt também pode inativar a caspase 9 humana, conhecida como iniciadora e efetora da apoptose, por meio da fosforilação do sítio Serina 196 (Song et al., 2005).

O fator induzido por hipóxia 1 alfa ou fator transcricional regulador da resposta adaptativa a hipóxia (HIF-1 α) é um importante fator de transcrição para a célula sob hipóxia, pois ativa a expressão de muitos genes de sobrevivência celular. O fosfatidil inositol-3 quinase (PI3-k) fosforila a Akt que eventualmente induz a ativação do HIF-1 α , inibindo o colapso mitocondrial. Assim a via PI3k/Akt/HIF1 α é uma importante via de sobrevivência celular (Kandel e Hay, 1999).

A estimulação vagal também inibe o processo apoptótico na isquemia do miocárdio. A possível explicação seria a ativação da via PI3k/Akt/HIF1 α intracelular. Isso reforça a evidência de que a acetilcolina tem um efeito protetor sobre os cardiomiócitos de rato sujeitos a hipóxia/ normóxia por aumentar a fosforilação da Akt, evitando assim a apoptose produzida por hipóxia e o colapso do potencial de membrana mitocondrial (Kakinuma et al., 2005).

A mitocôndria tem papel decisivo na morte celular, relacionado à manutenção do gradiente eletroquímico pela membrana interna que praticamente é impermeável a todos os íons. A lesão isquêmica pode ativar o mecanismo de abertura de um poro não específico na membrana mitocondrial interna, o Poro de Transição de permeabilidade Mitocondrial (PTP). A abertura prolongada do PTP leva a morte celular através da rápida depleção de ATP e ativação de mensageiros de morte celular, tais como as caspases. A estimulação elétrica do nervo vago teve um efeito cardioprotetor, após período de isquemia, reduzindo o tamanho do infarto independente da frequência cardíaca e preservando a função mitocondrial por bloquear a abertura do Poro de Transição de Permeabilidade (PTP) mitocondrial. Nesse estudo, a estimulação vagal induziu a fosforilação da Akt e Bad, que são importantes fatores pré-mitocondriais de sobrevivência celular. A fosforilação de Bad impediu sua translocação para mitocôndria e ligação com Bcl2 (gene antiapoptótico), o que é essencial para manter o PTP fechado. A estimulação vagal também inibiu a liberação mitocondrial do citocromo c no citosol e ativação da caspase-3. Esses resultados demonstram que a estimulação vagal é capaz de inibir as três fases da morte celular por apoptose (Katare et al., 2009).

No trabalho desenvolvido por Uemura et al. (2010), após 24 horas de isquemia-reperfusão, coelhos infartados que receberam estimulação vagal mostraram significativa diminuição do infiltrado miocárdico de neutrófilos e reduzida expressão miocárdica do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e matriz de metaloproteinases MMP-8 e MMP-9, quando comparado com animais infartados que não receberam estimulação. A estimulação vagal conseguiu suprimir as reações inflamatórias agudas. Contudo, a expressão das interleucinas IL-6 e IL-1 β não sofreu alteração pela estimulação vagal. Em um segundo estudo, os coelhos sujeitos a oclusão coronariana e reperfusão foram separados em dois grupos, um grupo controle e um grupo que recebeu estimulação vagal por 3 dias. Após 8 semanas, coelhos que

receberam estimulação vagal tiveram significativa melhora na função do ventrículo esquerdo, menor dilatação, e ainda, significativa redução no tamanho do infarto.

Outra forma de estimular a ação vagal sobre o coração, clinicamente menos invasiva, é a utilização de drogas com efeitos anticolinesterásicos, que promovem aumento da neurotransmissão parassimpática por, periféricamente, diminuir a degradação enzimática da acetilcolina na junção neuroefetora, prolongando a disponibilidade desse neuromediador e aumentando seu tempo de atuação nos receptores colinérgicos (Androne et al., 2003).

O Brometo de Piridostigmina é um composto sintético derivado do ácido carbâmico com ação de inibir reversivelmente a acetilcolinesterase, não atravessa a barreira hematoencefálica e tem efeito colinérgico dose-dependente. Drogas com ação anticolinesterásica estão relacionadas à ativação de receptores nicotínicos pelo aumento da acetilcolina na placa motora do músculo esquelético ou nos gânglios autonômicos ou receptores muscarínicos nas proximidades das terminações nervosas parassimpáticas colinérgicas (Bibeovski & Dunlap, 1999). A piridostigmina vem sendo usada na prática clínica no tratamento dos sintomas relacionados à Miastenia gravis, por aumentar a concentração de Ach na placa motora, aumentando o tônus e força muscular. Também tem sido usada no tratamento dos sintomas da doença de Alzheimer, esclerose múltipla e como medida profilática contra intoxicação por armas químicas, tendo sido usada na guerra do Golfo (Richtsfeld et al. 2013). Anticolinesterásicos atuam diretamente nas terminações pós-ganglionares cardíacas, aumentando a concentração de acetilcolina endógena via hidrólise reduzida e estimulando os receptores M_2 cardíacos (Behling et al., 2003).

No ambiente clínico, a disfunção autonômica, caracterizada pelo aumento da atividade simpática e redução da modulação vagal, provoca diminuição da variabilidade da frequência cardíaca e está envolvida na patogênese de arritmias ventriculares e morte súbita cardíaca em pacientes com doença cardíaca (La Rovere et al., 2001). Estudos apontaram que a inibição da

acetilcolinesterase com brometo de piridostigmina provocou bradicardia de repouso, reduziu arritmias ventriculares e aumentou a variabilidade da frequência cardíaca (Behling et al., 2003). Também foram observados aumentos na variabilidade da frequência cardíaca e na sensibilidade barorreflexa, sem modificações hemodinâmicas, em ratos normais tratados com brometo de piridostigmina (Soares et al., 2004).

A estimulação colinérgica com brometo de piridostigmina aumentou a recuperação da frequência cardíaca no primeiro minuto após o exercício, sugerindo uma melhora do tônus parassimpático em pacientes com insuficiência cardíaca (Androne et al, 2003).

O tratamento prolongado com piridostigmina (Sabino et al., 2013; Sabino et al., 2013; Lataro et al., 2013; Durand et al., 2014) melhorou os parâmetros cardiocirculatórios e autonômicos em ratos e camundongos com insuficiência cardíaca. A piridostigmina foi eficiente na prevenção da atenuação da sensibilidade barorreflexa, evitou mudanças na frequência cardíaca intrínseca e no controle autonômico cardiovascular, examinado pela variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial e tônus parassimpático cardíaco. Contudo, não houve nenhum benefício na melhora da função cardíaca após um período de 6 a 7 semanas de insuficiência cardíaca (Sabino et al., 2013).

Recentemente, Santos-Almeida et al. (2014) demonstraram os efeitos cardioprotetores de uma dose única, em bolus, de brometo de piridostigmina, administrada endovenosamente, no início do infarto agudo do miocárdio em ratos. Estes autores demonstraram que a piridostigmina induziu uma rápida, porém passageira bradicardia de cerca de 1,5 – 2 horas e preveniu o prolongamento do intervalo QT atingido, bem como reduziu a incidência de extrassístoles ventriculares associadas ao IAM. Tais efeitos foram associados com uma significativa recuperação do conteúdo de conexina 43 no ventrículo esquerdo. Ainda que estes efeitos cardioprotetores fossem marcantes, os autores não evidenciaram os efeitos da piridostigmina sobre a frequência e duração de arritmias cardíacas mais graves, tais como

taquicardia e fibrilação ventriculares, bem como não encontrarem um efeito significativo sobre a taxa de mortalidade pós-IAM nas primeiras 4 horas de observação (Santos-Almeida et al., 2014).

É possível que essa falta de efeitos significativos sobre a taxa de arritmias graves e sobre a mortalidade seja decorrente do regime de administração da piridostigmina (dose única em bolus), a qual provocou bradicardia apenas nas primeiras duas horas de observação. A administração de uma segunda ou terceira dose de piridostigmina, a fim de manter a resposta bradicárdica ao longo de todo o período de observação, poderia trazer um benefício mais prolongado, afetando a incidência de arritmias graves e diminuindo a mortalidade.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar os efeitos da estimulação colinérgica com brometo de piridostigmina na fase aguda do infarto do miocárdio em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 avaliar os efeitos da estimulação colinérgica na fase aguda do infarto do miocárdio sobre parâmetros hemodinâmicos cardíacos e respiratórios em ratos anestesiados.

2.2.2 Quantificar a duração e a frequência dos eventos arrítmicos observados, bem como, o tamanho do infarto e a mortalidade dos animais anestesiados submetidos ao infarto agudo do miocárdio.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Trinta e seis ratos Wistar machos com aproximadamente 16 semanas de idade (peso aproximado de 300-450 gramas) foram empregados em todos os protocolos experimentais do presente estudo. Os animais estiveram alojados no Biotério da disciplina de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro em um ambiente com controle de temperatura ($23\pm 1^\circ$ C), umidade relativa (40-70%), ciclo claro-escuro de 12h/12h (luzes acesas às 7:00 horas), acondicionados confortavelmente em caixas plásticas (40 x 34 x 17 cm) forradas com maravalha autoclavada e com livre acesso à ração balanceada (Nuvilab) e água filtrada até o dia do experimento. Todos os procedimentos foram realizados observando-se as normas exigidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de Laboratório (CEUA).

3.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

3.2.1 Preparação para indução do Infarto Agudo do Miocárdio

Após anestesia com tiopental sódico (40 mg/Kg via intraperitoneal), a traqueia foi canulada (polietileno PE-240) e conectada a um ventilador artificial (Animal Ventilator, Columbus Instruments, Columbus, Ohio, USA), com volume corrente de ventilação e frequência respiratória de 3 ml e 90 resp./minuto, respectivamente. O ventilador tem como finalidade permitir a posterior abertura do tórax para a ligadura da artéria coronária.

A cirurgia de preparação para indução do infarto do miocárdio foi produzida segundo técnicas previamente descritas (Selye et al., 1960; Pfeffer et al., 1979). O animal, ainda sob ventilação controlada, foi mantido em mesa cirúrgica em decúbito dorsal, imobilizado e

submetido à tricotomia da região da face anterior do hemitórax esquerdo e antissepsia (álcool iodado). Uma incisão lateral de aproximadamente 3 cm e a divulsão dos músculos peitoral e transversos permitiu a toracotomia no 4º ou 5º espaço intercostal esquerdo. O coração foi exteriorizado rapidamente por compressão lateral do tórax. Após a ruptura do pericárdio, um fio de sutura (mononylon 5-0) foi passado em torno da artéria coronária descendente anterior esquerda a uma distância cerca de 3-4 mm abaixo de sua origem, entre a borda do átrio esquerdo e o sulco da artéria pulmonar.

Adaptando a técnica descrita no trabalho de Johnston, MacLeod e Walker (1983), um oclisor foi desenvolvido, isto é, uma das extremidades do fio de sutura (mononylon 5-0), que foi passado em torno da artéria coronária, foi fixada na guia de polietileno (PE-10) enquanto que a outra extremidade foi passada por dentro da guia de polietileno, através da borda alargada da guia, formando um laço que poderia ser apertado puxando-se o fio de sutura através da guia na sua extremidade exteriorizada. Esse oclisor foi suturado na parede do tórax e exteriorizado na região do pescoço, de modo que essa técnica permitiu que o fio em torno da coronária fosse posteriormente tracionado para produzir uma completa oclusão da coronária durante o protocolo experimental (Johnston, MacLeod e Walker, 1983).

A seguir, o coração foi rapidamente recolocado na cavidade torácica. O tórax expandido por aumento do volume corrente do ventilador, e então fechado e submetido a uma drenagem do pneumotórax cirúrgico por aspiração a vácuo do conteúdo aéreo do espaço pleural esquerdo, por meio de um cateter exteriorizado na incisão cirúrgica. Após a drenagem do pneumotórax e fechamento da caixa torácica, foi realizada novamente a expansão pulmonar com o ventilador artificial e em seguida, o fechamento da pele.

Ao final da cirurgia, foi feita aplicação intramuscular de anti-inflamatório e antibiótico (Voltarem 75 mg em 0,5 ml e Pentabiótico em 0,3 ml, i.p.) em todos os animais que, em seguida, ficaram em recuperação por 7 a 10 dias. Cada rato ficava isolado em uma caixa por 3

dias para recuperação pós cirúrgica. Após esse período, os animais eram agrupados, para evitar estresse por isolamento social.

3.2.2 Canulação dos vasos femorais

Sete a dez dias depois, após anestesia com uretana (1,2 g/kg, i.p.) os animais foram colocados em decúbito dorsal e a tricotomia feita na região medial do membro posterior esquerdo. Após a incisão, foram implantadas na artéria e veia femoral esquerda cânulas de polietileno (PE-10 fundido a uma extensão de PE-50) (Clay Adams Brand, Polyethylene Tubing, Becton Dickinson, Sparks, USA, PE 10 e PE 50) preenchidas com uma mistura de heparina e solução fisiológica. O intuito desse procedimento é permitir a aquisição de sinais de pressão arterial (cateter arterial) e a infusão de drogas ou anestésico (cateter venoso), respectivamente.

3.3 ESTUDO ELETROCARDIOGRÁFICO

O estudo eletrocardiográfico convencional, antes da indução do infarto e imediatamente após a indução do infarto ou cirurgia fictícia (sham) foi realizado com os animais anestesiados com uretana (1,2 g/Kg de massa corpórea, i.p) em decúbito dorsal. Dessa forma, foi realizado um registro eletrocardiográfico completo (6 derivações do plano frontal e/ou 6 derivações precordiais) utilizando-se um eletrocardiógrafo de 6 canais (ER 661 Micromed Budapst, Hungria) conectado a um sistema de aquisição de dados (WINDAQ/PRO, DATAQ Instruments, Inc., Akron, OH, USA) acoplados a um computador pessoal. Eletrodos em agulha foram conectados ao animal de acordo com o padrão estabelecido para obtenção das derivações clássicas bipolares (DI, DII e DIII) e Unipolares

(aVR, aVL e aVF) do membros. As derivações precordiais foram as seguintes: V1= eletrodo colocado no 4º espaço intercostal sobre a linha parasternal direita; V2= eletrodo a esquerda do esterno no 4º espaço intercostal; V3= eletrodo situado entre as posições V2 e V4; V4= o eletrodo é colocado no 5º espaço intercostal esquerdo na linha hemiclavicular; V5 = eletrodo no 5º espaço intercostal esquerdo na linha axilar anterior e V6 = o eletrodo é colocado ao nível de V4 sobre a linha axilar média.

3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Após 7 a 10 dias de recuperação da cirurgia de preparação para indução do infarto, o rato foi selecionado aleatoriamente em uma das caixas e anestesiado com uretana (1,2 g/Kg via intraperitoneal) para cirurgia de canulação dos vasos femorais. Após os procedimentos cirúrgicos citados e ainda sobre ação do anestésico, o animal foi conectado a um transdutor de pressão através da cânula da artéria femoral para a medida da pressão arterial e a um amplificador de sinais (Model 8805A, Hewlett-Packard, USA). A seguir, o rato foi entubado tendo a traqueia canulada (polietileno PE-240) e ligada, através de um tubo em Y, a um monitor de CO₂ do ar expirado (Capstar, Harvard Apparatus, USA). Esse monitor é fundamental para se avaliar o estado de ventilação espontânea do animal. Também foram conectados os eletrodos convencionais do eletrocardiograma, para o registro das seis derivações simultâneas do plano horizontal, como descrito acima.

3.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

No presente trabalho, quatro grupos experimentais foram estudados:

- a) grupo sham tratado com solução fisiológica (n=8);
- b) grupo sham (cirurgia fictícia em que o fio de sutura foi passado fracamente, não obstruindo a coronária) tratado com brometo de piridostigmina (n=8);
- c) grupo infartado tratado com solução fisiológica (n=10);
- d) grupo infartado tratado com brometo de piridostigmina (n=10).

3.6 ANÁLISE DE DADOS

Os sinais de ECG, pressão arterial e CO₂ no volume respiratório corrente foram coletados em uma frequência de amostragem de 2000 Hz do um sistema computadorizado de aquisição de dados (WINDAQ/PRO, DATAQ Instruments, Inc., Akron, OH, USA) e posteriormente armazenados em discos laser, para ulterior análise “off-line”.

Os sinais de pressão arterial, ECG, e CO₂ tiveram registros em condições basais por aproximadamente 20 minutos. Em seguida, o fio de sutura em torno da artéria coronária esquerda foi tracionado por dentro do polietileno e fixado na parede do mesmo por aquecimento, instalando-se assim uma oclusão aguda do fluxo sanguíneo pela artéria coronária. Após um período de estabilização da preparação e de um registro basal da PA de aproximadamente 5 minutos, um grupo de animais recebeu solução salina enquanto que no outro grupo de animais infartados o protocolo de estimulação colinérgica com brometo de piridostigmina teve início. Nesse estudo, a piridostigmina foi administrada em bolus, com doses ajustadas para cada animal (0,3 mg/Kg/bolus, 0,5 mg/Kg/bolus ou 0,6 mg/Kg/bolus i.v.) de modo que a frequência cardíaca diminuísse de 10-20% de seu valor basal pré-tratamento.

O bolus foi administrado a cada hora para prolongar o efeito da piridostigmina ao longo das quatro horas do experimento.

Todos os parâmetros foram, em seguida, continuamente registrados por um período máximo de quatro horas ou até a morte espontânea do animal. Nenhum procedimento de ressuscitação foi realizado em caso de arritmia fatal. Imediatamente após a morte espontânea ou no final das quatro horas de registro, no caso dos os animais sobreviventes sacrificados com uma alta dose de quetamina intravenosa (200 mg/kg i.v.), os corações foram removidos e processados para a avaliação do tamanho do infarto.

3.6.1 Arritmias cardíacas

Intervalo RR, PA média e respiração foram medidos a intervalos regulares antes e durante o período de 4 horas após a ligadura coronária.

As arritmias verificadas no ECG foram analisadas obedecendo às convenções de Lambeth (Walker et al., 1988). Taquicardia ventricular (TV) será definida como 4 ou mais extrassístoles ventriculares consecutivas. Fibrilação ventricular (FV) será definida como um sinal que se altera aleatoriamente tanto em frequência quanto em morfologia. O número e a duração de cada episódio de TV ou FV será quantificado por rato e usado como um índice de arritmia de cada animal.

Arritmias foram classificadas em extrassístoles ventriculares ou contrações ventriculares prematuras (CVP), taquicardia ventricular (TV) ou flutter e fibrilação ventricular (FV). Quatro ou mais eventos consecutivos de CVP foram considerados TV. Na taquicardia ventricular (> 500 batimentos/min), a pressão arterial diminuiu ligeiramente e o ECG mostrou uma falta de ritmo sinusal, com complexos QRS alongados. No flutter o ECG evidencia complexos QRS alargados associados à queda da pressão arterial para 30-60 mmHg. A fibrilação ventricular foi quantificada seja como padrão clássico ou como “torsades de

pointes” (inversão das pontas), enquanto a pressão arterial caiu abruptamente a aproximadamente 0 (zero) mmHg (Johnston, MacLeod e Walker, 1983). Alguns ratos tiveram defeitos de condução atrioventricular e (ou) bradicardia que foram registrados como episódios de bradicardia.

3.6.2 Pontuação das arritmias cardíacas

Histórias de arritmia foram pontuadas em uma escala de 0-8 de arritmia para o período após a ligação de 0-4h. O valor 0 (zero) foi dado para ocorrência de 0-50 episódios de contrações ventriculares prematuras (CVP) sem taquicardia ventricular (TV) ou fibrilação ventricular (FV); 1 para 50 a 500 episódios de CVP somente; 2 para mais de 500 CVP ou um episódio espontaneamente reversível de TV ou FV; 3 para mais do que um episódio de TV ou FV reversíveis espontaneamente, ou um ou mais episódios de TV não espontaneamente reversíveis com duração inferior a 60 s; 4, por episódios reversíveis de TV e (ou) de FV durando de 60s a 120 s; 5, para episódios de TV ou FV com duração superior a 120s; 6, para episódio irreversível de FV causando morte dentro de 15-240min da ligadura; 7, para a episódio de FV fatal dentro de 4-15min da ligadura e, finalmente, 8, para FV fatal dentro de 4 minutos da ligadura coronariana. Esta escala é baseada em escalas anteriores (Au et al. 1979; Johnston, MacLeod e Walker, 1983).

3.7 AVALIAÇÃO DO TAMANHO DO INFARTO

Baseando-se no trabalho realizado por Opitz et al. (1995), dois métodos foram empregados para a avaliação do tamanho do infarto: a injeção do corante Azul de Evans e a coloração histológica com o Cloreto de Trifenil Tetrazolium (TTC). O ventrículo esquerdo foi cortado transversalmente em 4 a 6 fatias de cerca de 2 mm de espessura, após a injeção de corante ou antes da coloração com o TTC. O azul de Evans 1% foi empregado na estimativa do tamanho do infarto para aqueles corações que pararam com até 3 horas após a ligadura, um período onde a necrose ainda não foi completamente instalada. O azul de Evans foi injetado dentro das coronárias através de uma injeção retrógrada pela aorta ascendente. Nos corações que pararam com mais de 3 horas após a ligadura da coronária, o tamanho da área necrótica instalada foi avaliado pela incubação das fatias de ventrículo esquerdo em solução de TTC a 1% por 10-15 minutos em pH 7,8 e 37°C, seguido pelo banho das fatias por 5-10 minutos em formol a 10% para melhorar o contraste de cor. O TTC cora o tecido miocárdico viável de vermelho escuro, já que essa substância reage com o NADH e com as enzimas desidrogenases formando um precipitado vermelho denominado formazan. Por outro lado, a isquemia promove a retirada das enzimas desidrogenases das células necróticas fazendo com que não haja reação química e a coloração da área infartada permaneça pálida.

Após este processamento as fatias também foram fotografadas (câmera digital Sony cyber-shot) com o auxílio de uma lupa com aumento de 6,3 vezes. As imagens foram arquivadas e posteriormente analisadas pelo programa Image J (Image J 1.29, National Institute of Health, USA). O tamanho da área não-perfundida ou necrótica para ambas as superfícies endocárdica e epicárdica de cada fatia foi determinado por planimetria das lâminas fotográficas. O comprimento da área enfartada e a circunferência total de cada fatia para as superfícies endocárdica e epicárdica foram somadas separadamente. A razão destas somas definiu o tamanho do infarto em cada superfície do miocárdio. O tamanho total do infarto foi

estimado pela média do tamanho do infarto para cada superfície de corte multiplicada por 100. A transmuralidade do infarto foi quantificada pela razão entre o tamanho do infarto da superfície epicárdica dividido pelo tamanho do infarto na superfície endocárdica.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão. Para os parâmetros normalmente distribuídos quantificados ao longo do tempo, foi empregada uma ANOVA “two way” para medidas repetidas, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Para as variáveis quantitativas coletadas dos animais infartados, como o tamanho do infarto, frequência de arritmias, duração de episódios de arritmia, entre outras, o teste t-Student ou o teste de Mann Whitney foi empregado quando apropriado. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida e percentual de animais livres de arritmias foram comparadas nos dois grupos de animais pelo teste – F de Cox. Para todas as comparações, uma $p < 0,05$ foi considerada significativa.

4. RESULTADOS

4.1. PARÂMETROS BASAIS INICIAIS

Os animais utilizados no experimento apresentaram pesos corporais finais (em gramas) similares entre si (grupo Sham-Sal = 413±11g, grupo Sham-Pir = 368±20g, grupo Inf-Sal = 382±10g e grupo Inf-Pir = 393±15g, p não significativo).

Os parâmetros hemodinâmicos e respiratórios basais iniciais antes e após o procedimento indutor do infarto agudo do miocárdio pela ligadura ou não da artéria coronária descendente anterior podem ser observados na tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Valores médios (\pm erro padrão) de frequência cardíaca (FC, em bpm), pressão arterial média (PAM, em mmHg), concentração de CO₂ no volume respiratório corrente (CO₂c, em %) e frequência respiratória (FR, em rpm) nos quatro grupos experimentais medidos nos primeiros 20 minutos antes (período basal) e após os primeiros 5 minutos de infarto agudo do miocárdio (IAM), induzido por ligadura da artéria coronária descendente anterior.

	Sham-Sal (n=8)	Sham-Pir (n=8)	Inf-Sal (n=10)	Inf-Pir (n=10)
<i>Período Basal (20min.)</i>				
FC (bpm)	377±7	394±10	371±16	392±10
PAM (mmHg)	77±7	94±5	92±5	97±4
CO ₂ c (%)	3,31±0,10	3,28±0,20	3,32±0,21	3,28±0,24
FR (rpm)	143±9	126±19	142±10	171±11
<i>Pós-IAM (5min.)</i>				
FC (bpm)	375±7	390±10	434±15* ^{&}	448±13 ^{#&}
PAM (mmHg)	74±6	93±4	95±5	99±4
CO ₂ c (%)	3,15±0,11	3,29±0,19	3,19±0,22	3,13±0,23
FR (rpm)	150±12	123±15	149±12	170±17

mmHg = milímetro de mercúrio; bpm = batimentos por minuto, rpm = respirações por minuto, min. = minutos. *p<0,05 versus Inf-Sal basal, #p<0,05 versus Inf-Pir basal, &p<0,05 versus Sham-Sal no pós-IAM.

Note que os parâmetros basais medidos nos 20 minutos iniciais antes do infarto não diferiram entre os quatro grupos experimentais, como esperado. Após a ligadura da artéria coronária, os parâmetros de PAM, CO₂ corrente e FR se mantiveram constantes nos primeiros 5 minutos de registro, enquanto a frequência cardíaca sofreu um significativo aumento nos animais infartados (Tabela 1).

Além da elevação da frequência cardíaca, foi notório também a quase imediata modificação do segmento ST do eletrocardiograma, o qual sofreu uma progressiva elevação, principalmente nas derivações precordiais V3, V4, V5 e V6 iniciando-se por volta de 2-3 segundos após a ligadura e evoluindo até a estabilização cerca de 1 minuto depois (Figura 1). Este evento eletrocardiográfico, a elevação de ST, foi observado em todos os 20 animais infartados, denotando uma possível lesão isquêmica em parede anterior e lateral do ventrículo esquerdo, área normalmente perfundida pela artéria coronária descendente anterior.

Neste período inicial de 5 minutos prévio ao início do tratamento com brometo de piridostigmina, extrassístoles ventriculares frequentes foram observados em 6 (60%) animais do grupo infartado que recebeu salina (Inf-Sal) e em 4 (40%) dos animais do grupo infartado que recebeu brometo de piridostigmina (Inf-Pir). Episódios de taquicardia ventricular foram observados em um animal (10%) do grupo Inf-Sal e em um animal (10%) do grupo Inf-Pir. Nenhuma morte foi observada neste período inicial de 5 minutos após a indução de IAM.

4.2. ADMINISTRAÇÃO DE BROMETO DE PIRIDOSTIGMINA NOS ANIMAIS CONTROLES NÃO-INFARTADOS (SHAM)

Com o objetivo de evidenciar os efeitos hemodinâmicos, autonômicos e respiratórios do brometo de piridostigmina injetado endovenosamente, 16 animais submetidos à cirurgia fictícia de implante do oclusor coronário foram divididos em dois grupos experimentais: um grupo que recebeu bolos endovenosos de solução salina fisiológica a 0,85% (Sham-Sal, n=8)

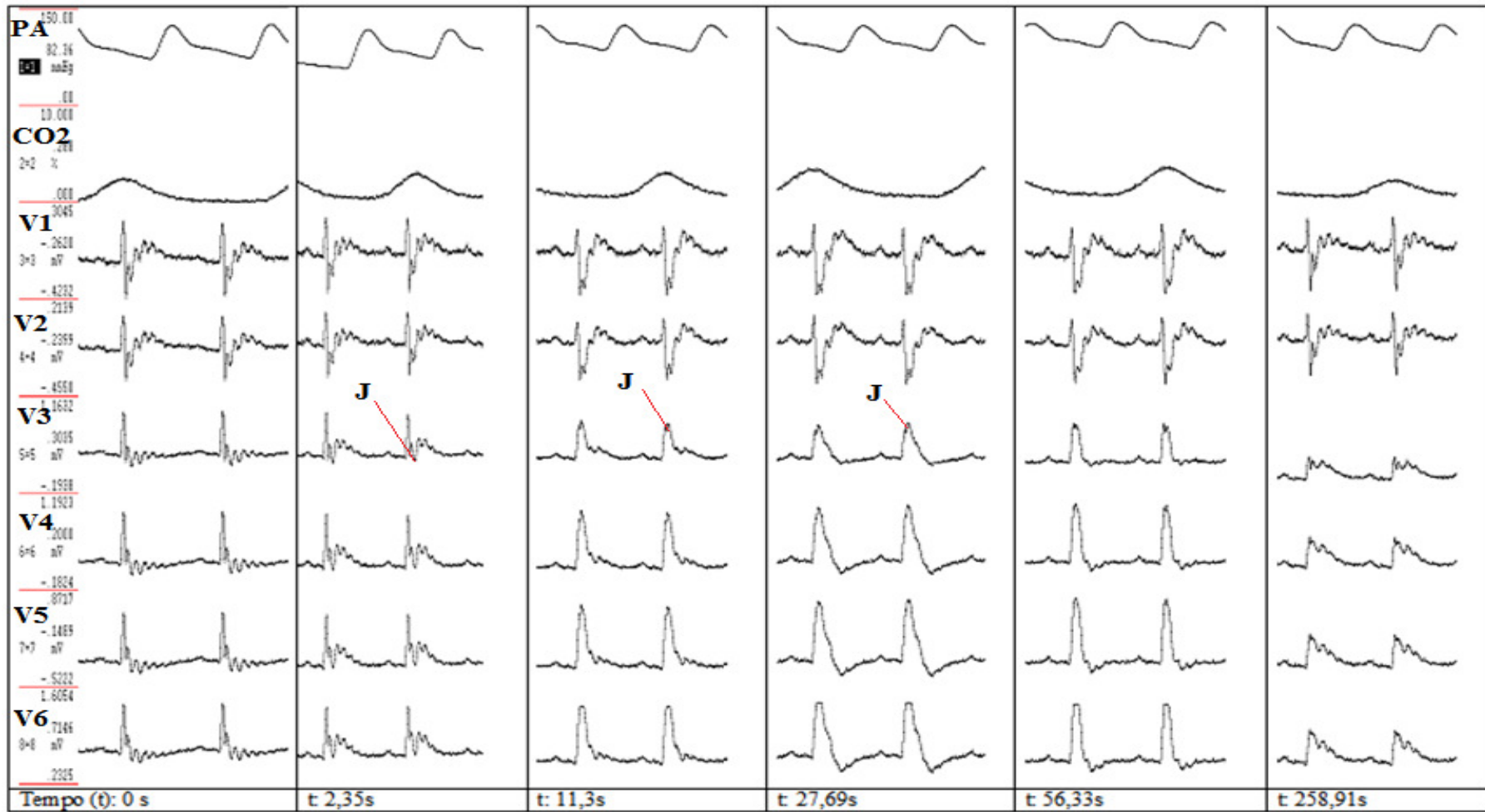


Figura 1: Traçado dos sinais de pressão arterial (PA), CO₂ corrente e eletrocardiograma nas derivações precordiais V1 a V6 de um animal representativo do grupo infartado tratado com salina (Inf-Sal) em diferentes tempos (em segundos, s), registrados ao longo dos primeiros 5 minutos de indução do IAM. Note a elevação do ponto J (segmento ST) a partir de 2,35 segundos e estabilização da elevação a partir de 56,33 segundos.

e outro grupo que recebeu doses endovenosas em bolos (2 a 4 bolos) de brometo de piridostigmina (variando de 0,3mg/Kg a 0,6mg/Kg, dose total média do grupo = $1,41 \pm 0,22$ mg/Kg). Tais dosagens variadas neste grupo aconteceram uma vez que o intuito central foi induzir uma queda da frequência cardíaca em torno de 15% (35-50bpm) do valor basal da FC. Os efeitos do brometo de piridostigmina sobre a frequência cardíaca, pressão arterial média, CO₂ corrente e frequência respiratória no grupo de animais sham tratados em comparação com o grupo sham que recebeu injeção de salina podem ser observados na figura 2 abaixo.

Pode se notar que o brometo de piridostigmina provocou uma imediata bradicardia nos animais Sham-Pir (em torno de 15% do valor basal), a qual se manteve durante as 4 horas de observação (Figura 2A). Além da bradicardia, nenhuma outra alteração no ECG foi notada. O brometo de piridostigmina não induziu modificações significativas nas outras variáveis (Figura 2B, 2C e 2D).

4.3. ADMINISTRAÇÃO DE BROMETO DE PIRIDOSTIGMINA NOS ANIMAIS INFARTADOS (INF)

4.3.1. Parâmetros Hemodinâmicos, Autonômicos e Respiratórios

Vinte animais submetidos à cirurgia de implante do oclusor coronário para indução do infarto agudo do miocárdio foram divididos em dois grupos experimentais: um grupo que recebeu após 5 minutos do IAM bolos endovenosos de solução salina fisiológica a 0,85% (Sham-Sal, n=10) e outro grupo que recebeu após 5 minutos do IAM doses endovenosas em bolos (2 a 4 bolos) de brometo de piridostigmina (variando de 0,3mg/Kg a 0,6mg/Kg, dose total média do grupo = $1,00 \pm 0,07$ mg/Kg, $p < 0,05$ versus grupo Sham-Pir). Tais dosagens

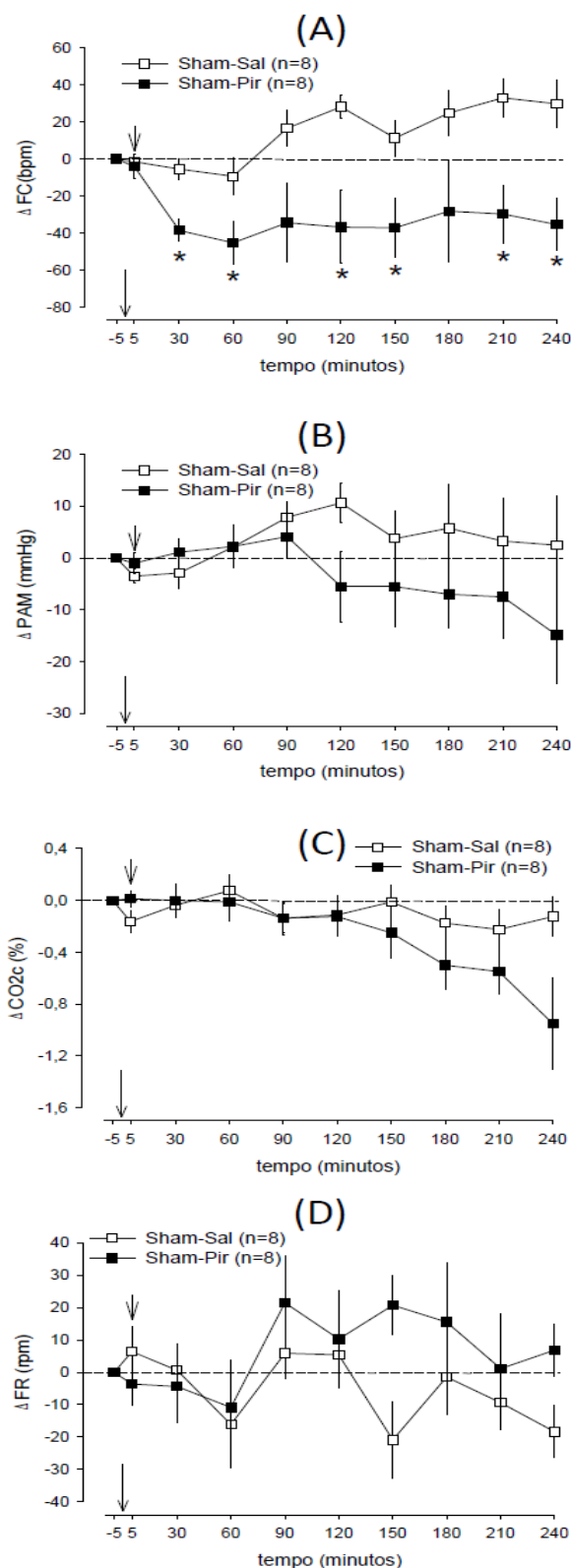


Figura 2: Valores médios (\pm erro padrão) das alterações em relação ao basal da frequência cardíaca (FC, em bpm, painel A), pressão arterial média (PAM, em mmHg, painel B), CO₂ corrente (CO₂c, em %, painel C) e frequência respiratória (FR, em rpm, painel D) dos grupos sham tratado com salina (Sham-Sal) ou com brometo de piridostigmina (Sham-Pir) ao longo do protocolo experimental. Seta vertical longa marca indução fictícia do IAM e seta vertical curta marca o início do tratamento. * $p < 0,05$ versus grupo Sham-Sal.

variadas neste grupo aconteceram uma vez que o intuito central foi induzir uma queda da frequência cardíaca da ordem de 15% do valor basal da FC prévio ao tratamento

Os efeitos do brometo de piridostigmina sobre a frequência cardíaca, pressão arterial, CO₂ corrente e frequência respiratória dos animais sobreviventes tanto do grupo de animais infartados tratados com brometo de piridostigmina, como do grupo infartado que recebeu injeção de salina podem ser observados na figura 3 abaixo.

Pode se notar que o brometo de piridostigmina provocou uma imediata bradicardia nos animais sobreviventes do grupo Inf-Pir (cerca de 15%-20% do valor basal), a qual se manteve durante as 4 horas de observação (Figura 3A). Além da bradicardia, pode se observar também que nos animais infartados tratados com brometo de piridostigmina, uma hipotensão arterial significativa foi observada a partir da terceira hora de ação do brometo de piridostigmina (Figura 3B). Ainda que nenhuma diferença significativa tenha sido observada nos parâmetros de CO₂ corrente e frequência respiratória entre os grupos Inf-Pir e Inf-Sal, o CO₂ corrente sofreu uma queda significativa ao longo do experimento, quando comparado aos animais Sham-Sal ($p < 0,05$ a partir da terceira hora de observação).

4.3.2. Taxa de Sobrevida

Dos 10 animais infartados no grupo infartado que recebeu salina (Inf-Sal), quatro (40%) morreram ao longo das quatro horas de observação. Já dos 10 animais infartados tratados com o brometo de piridostigmina (grupo Inf-Pir), apenas 1 animal (10%) veio a falecer durante o período de quatro horas de tratamento. As curvas de Kaplan-Meier de sobrevida nos dois grupos podem ser observadas na figura 4 abaixo. Uma forte tendência de melhor sobrevida foi observada no grupo tratado com brometo de piridostigmina ($P = 0,081$ versus grupo Inf-Sham, avaliado pelo teste-F de Cox). As mortes nos animais Inf-Sal foram

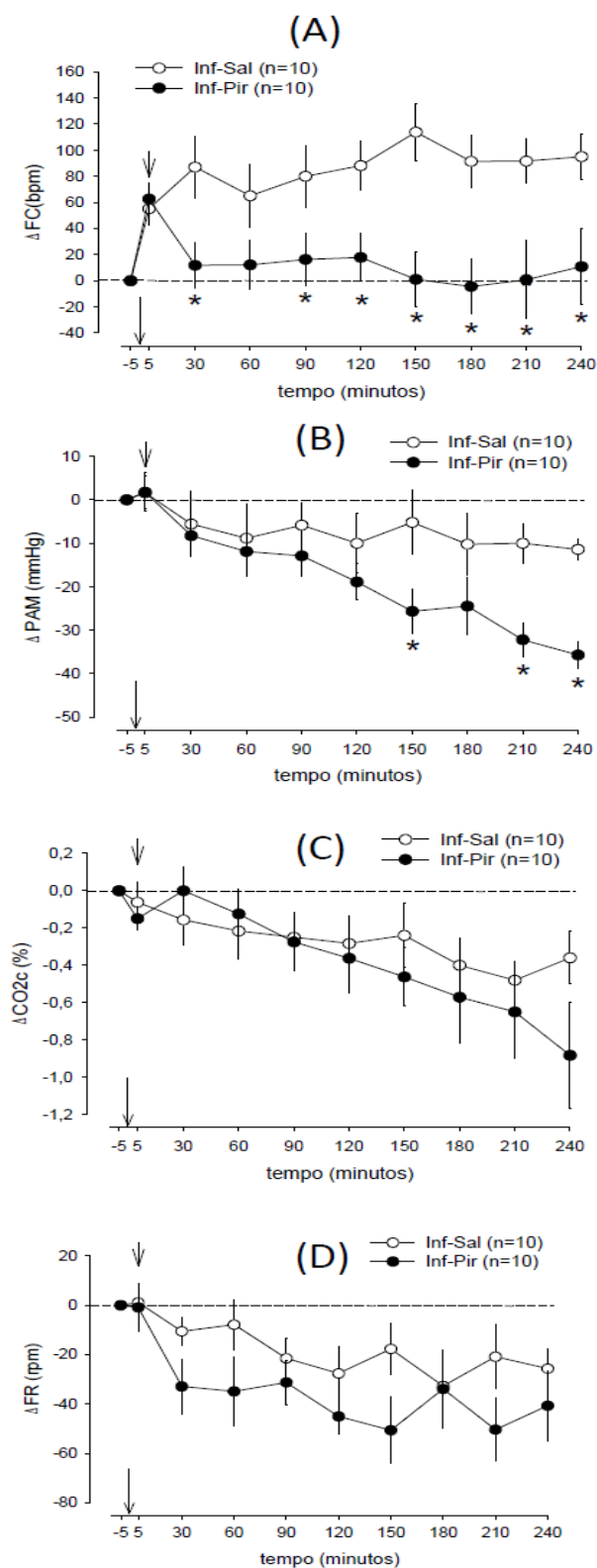


Figura 3: Valores médios (\pm erro padrão) das alterações em relação ao basal da frequência cardíaca (FC, em bpm, painel A), pressão arterial média (PAM, em mmHg, painel B), CO₂ corrente (CO₂c, em %, painel C) e frequência respiratória (FR, em rpm, painel D) dos grupos de animais infartados tratado com salina (Inf-Sal) ou com brometo de piridostigmina (Inf-Pir) ao longo do protocolo experimental. Seta vertical longa marca indução do IAM e seta vertical curta marca o início do tratamento. * $p < 0,05$ versus grupo Inf-Sal.

decorrentes de falência mecânica (hipotensão arterial grave) em três animais e fibrilação ventricular em um animal, enquanto a morte observada no grupo Inf-Pir foi decorrente de falência mecânica (hipotensão arterial grave).

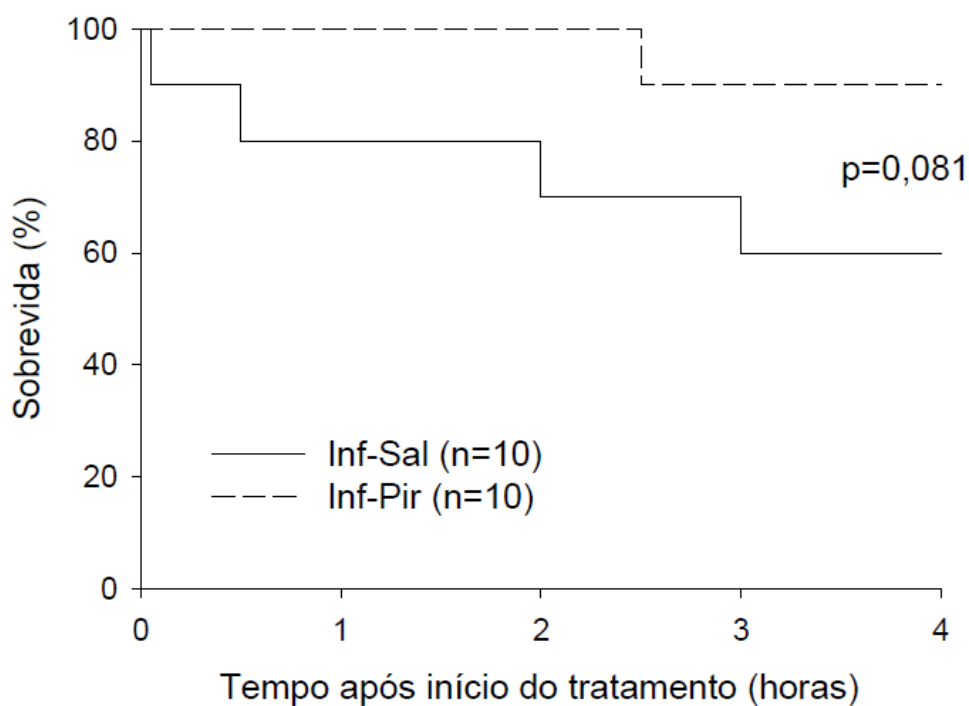


Figura 4: Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para os grupos de animais infartados tratados com salina (Inf-Sal) ou com brometo de piridostigmina (Inf-Pir) ao longo das quatro horas de observação. Note o valor de $p=0,081$ avaliado pelo teste-F de Cox.

4.3.3. Arritmias Cardíacas

Como já descrito anteriormente na seção 4.1, após a indução do IAM ambos os grupos nos primeiros 5 minutos antes do tratamento já evidenciaram a ocorrência frequente de arritmias, principalmente extrassístoles ventriculares isoladas ou às vezes com períodos de bigeminismo e mais raramente episódios de taquicardia ventricular não sustentada de curta duração. Após os 5 minutos iniciais e ao longo das quatro horas de tratamento inúmeros episódios de extrassístoles ventriculares (ESV) isoladas ou em bi- ou trigeminismo foram observados (figura 5). Ainda que o tratamento com o brometo de piridostigmina tenha sido capaz de reduzir a frequência de ocorrência das ESVs ($273 \pm 79/100.000$ batimentos versus $598 \pm 310/100.000$ batimentos no grupo Inf-Sal) e aumentar o percentual de animais sem EVSs ao longo das 4 horas (20% ao final das 4 horas versus 0% nos animais Inf-Sal), tais diferenças em relação aos animais que receberam apenas salina não atingiram níveis de significância estatística (Figuras 5 e 6).

Incontáveis episódios de taquicardia ventricular (TV) não sustentada, alguns com descompensação hemodinâmica e hipotensão arterial severa (caracterizado assim como flutter ventricular) (figuras 7 e 8) foram observados em 9 (90%) animais do grupo infartado sham e em 6 (60%) animais do grupo infartado tratado ($p=0,303$ pelo teste exato de Fisher). Ainda que o tratamento com o brometo de piridostigmina tenha sido capaz de reduzir a frequência de ocorrência ($3,7 \pm 1,5$ /hora versus $18,7 \pm 9,3$ /hora no grupo Inf-Sal), a duração média ($4,2 \pm 2,1$ s versus $13,1 \pm 11,4$ s no grupo Inf-Sal) e a duração total ($16,2 \pm 10,3$ s versus $64,3 \pm 51$ s no grupo Inf-Sal) dos episódios de taquicardia/flutter ventriculares e, em adição, aumentar o percentual de animais sem taquicardia/flutter ventriculares ao longo das 4 horas (40% ao final das 4 horas versus 10% dos animais Inf-Sal), tais diferenças em relação aos animais que receberam apenas salina não atingiram níveis de significância estatística (Figura 8).



Figura 5: Traçados dos sinais de pressão arterial (PA), CO₂ corrente e eletrocardiograma nas derivações precordiais V1 a V6 de um animal representativo do grupo infartado tratado com salina (Inf-Sal) no período basal (à esquerda) e depois de 10 minutos do IAM (à direita), mostrando algumas extrasístoles ventriculares, indicadas por setas.

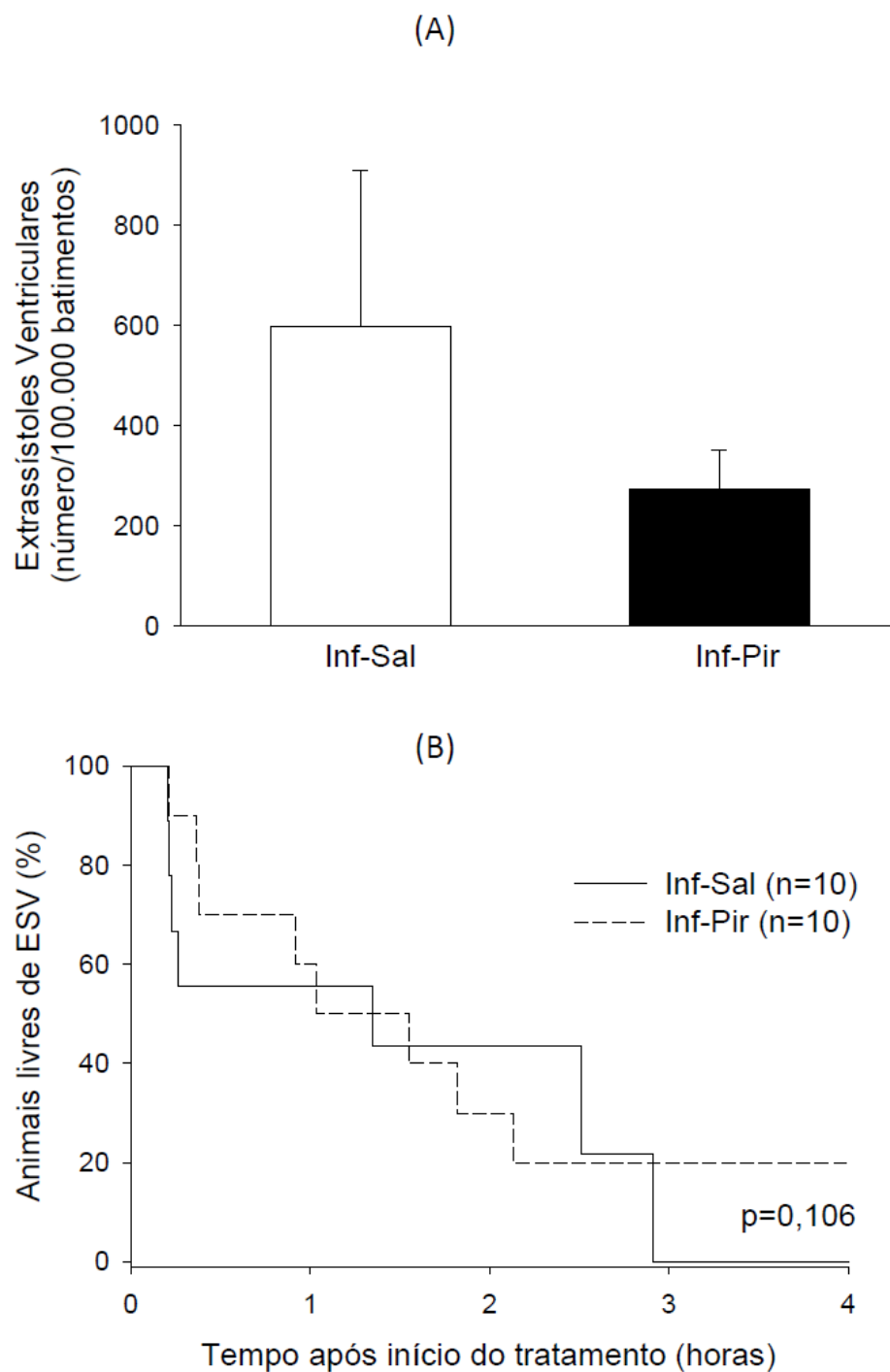


Figura 6 (Painel A): frequência de ocorrência das ESVs (em ESVs/100.000 batimentos) nos dois grupos infartados. (Painel B): Curva de Kaplan-Meier do percentual de animais sem ESVs ao longo das quatro horas. Note a tendência de proteção do brometo de piridostigmina, ainda que não significativa ($p=0,106$).

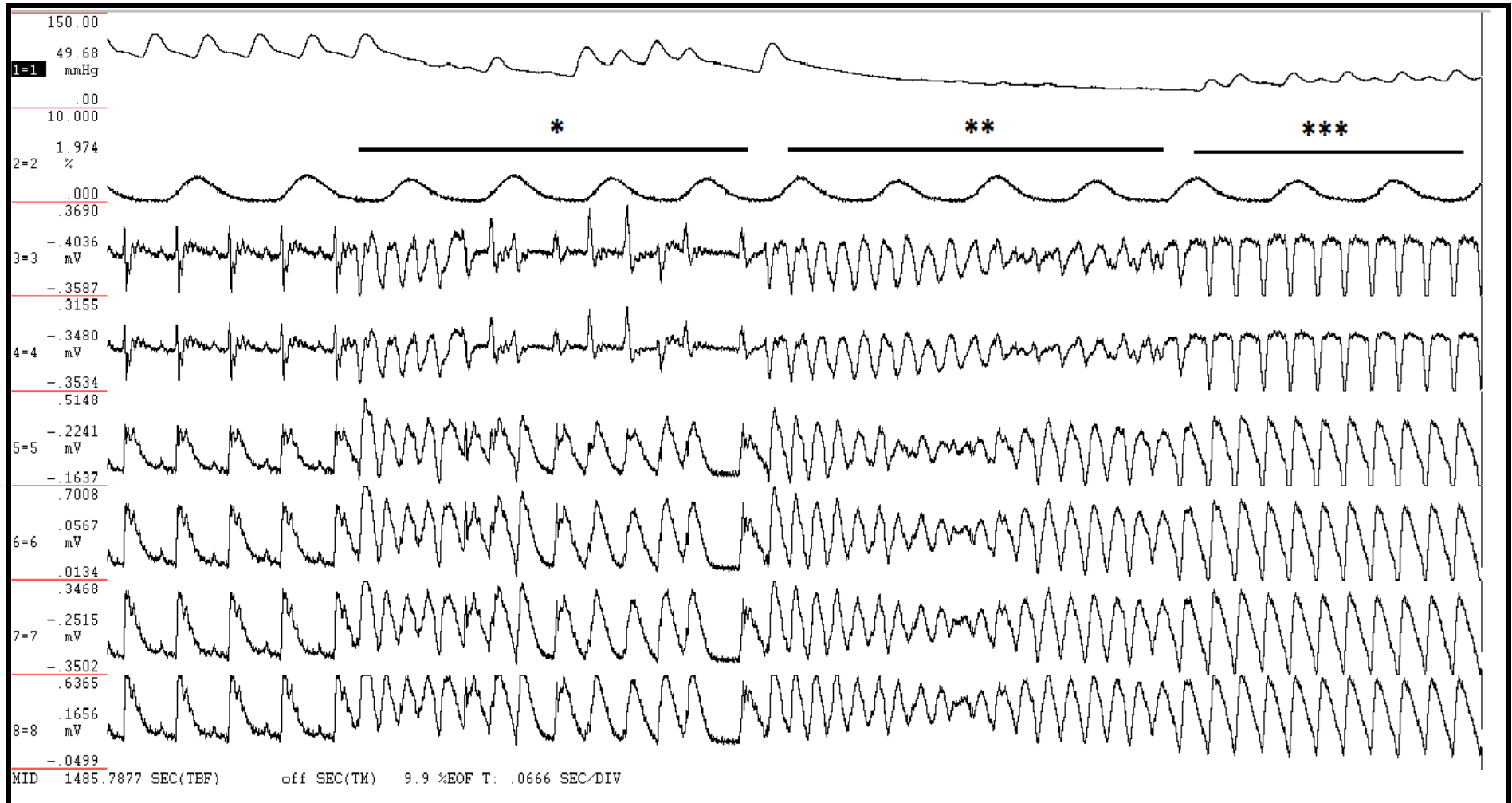


Figura 7: Traçado dos sinais de pressão arterial (PA), CO2 corrente e eletrocardiograma nas derivações precordiais V1 a V6 de um animal representativo do grupo infartado tratado com salina (Inf-Sal) evidenciando um curto período de taquicardia ventricular (*), “Torsades de Pointes” (**) e flutter ventricular (***).

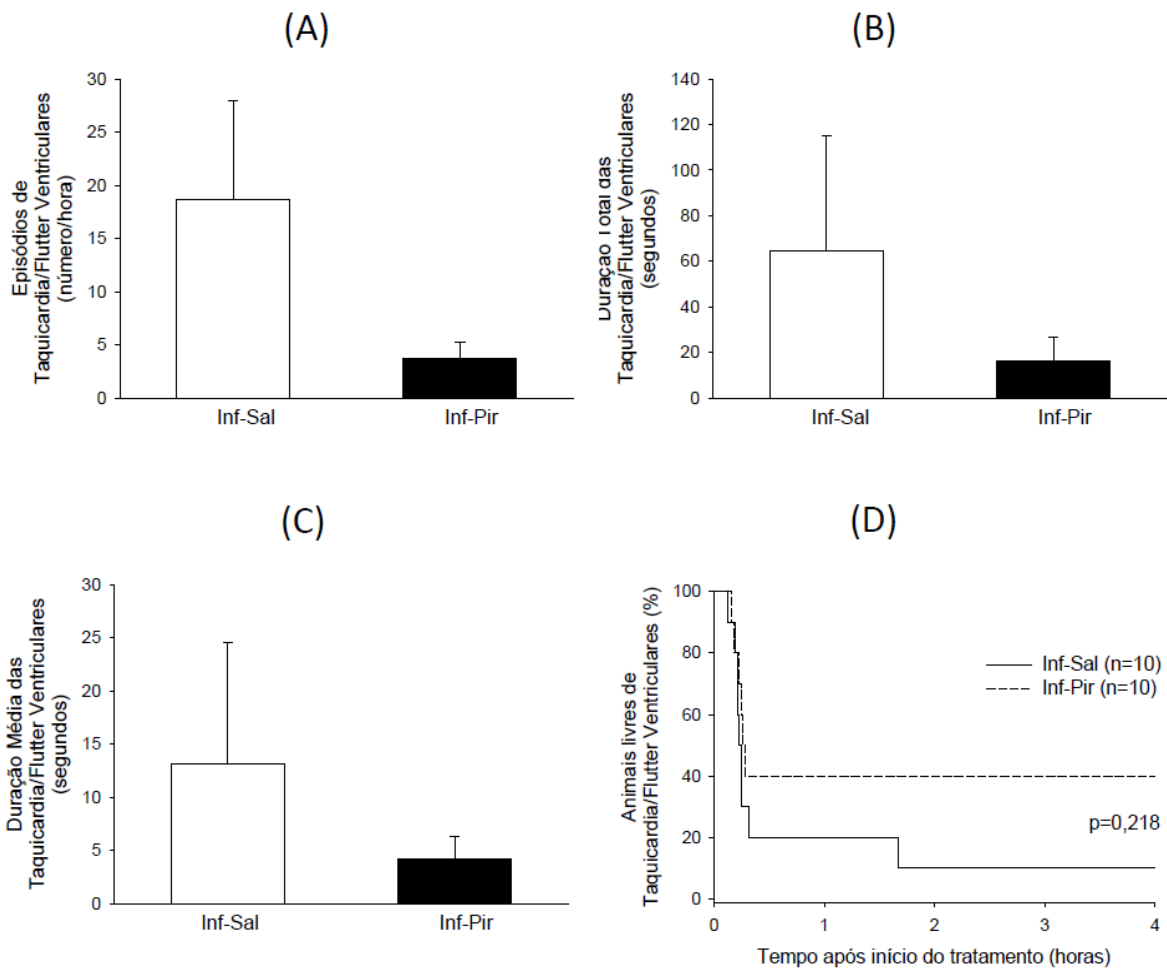


Figura 8 (Painel A): Episódios de taquicardia/flutter ventriculares (número/hora). (Painel B): Duração total de taquicardia/flutter ventriculares (em segundos). (Painel C): Duração média de taquicardia/flutter ventriculares (em segundos). (Painel D): Curvas de Kaplan-Meier do percentual de animais sem taquicardia/flutter ventriculares ao longo das quatro horas. Note a tendência de proteção do brometo de piridostigmina, ainda que não significativa ($p=0,218$).

Fibrilação ventricular foi observada em dois animais do grupo infartado que receberam salina, sendo uma delas, fatal (Figura 9). Dois animais do grupo infartado tratado com brometo de piridostigmina também apresentaram episódios de fibrilação ventricular, porém foram de curta duração (<25 segundos), não sustentadas e não indutoras de morte. A duração média dos episódios de fibrilação ventricular foi menor ($8,7\pm 3,9s$ versus $56,9\pm 23,0s$ no grupo Inf-Sal, $p<0,05$), assim como a duração total dos eventos de fibrilação ventricular nos ratos acometidos foi significativamente reduzida nos animais tratados com o brometo de piridostigmina ($26,0\pm 0,8s$ versus $227,9\pm 26,52$ no grupo Inf-Sal, $p<0,05$) (Figura 10).

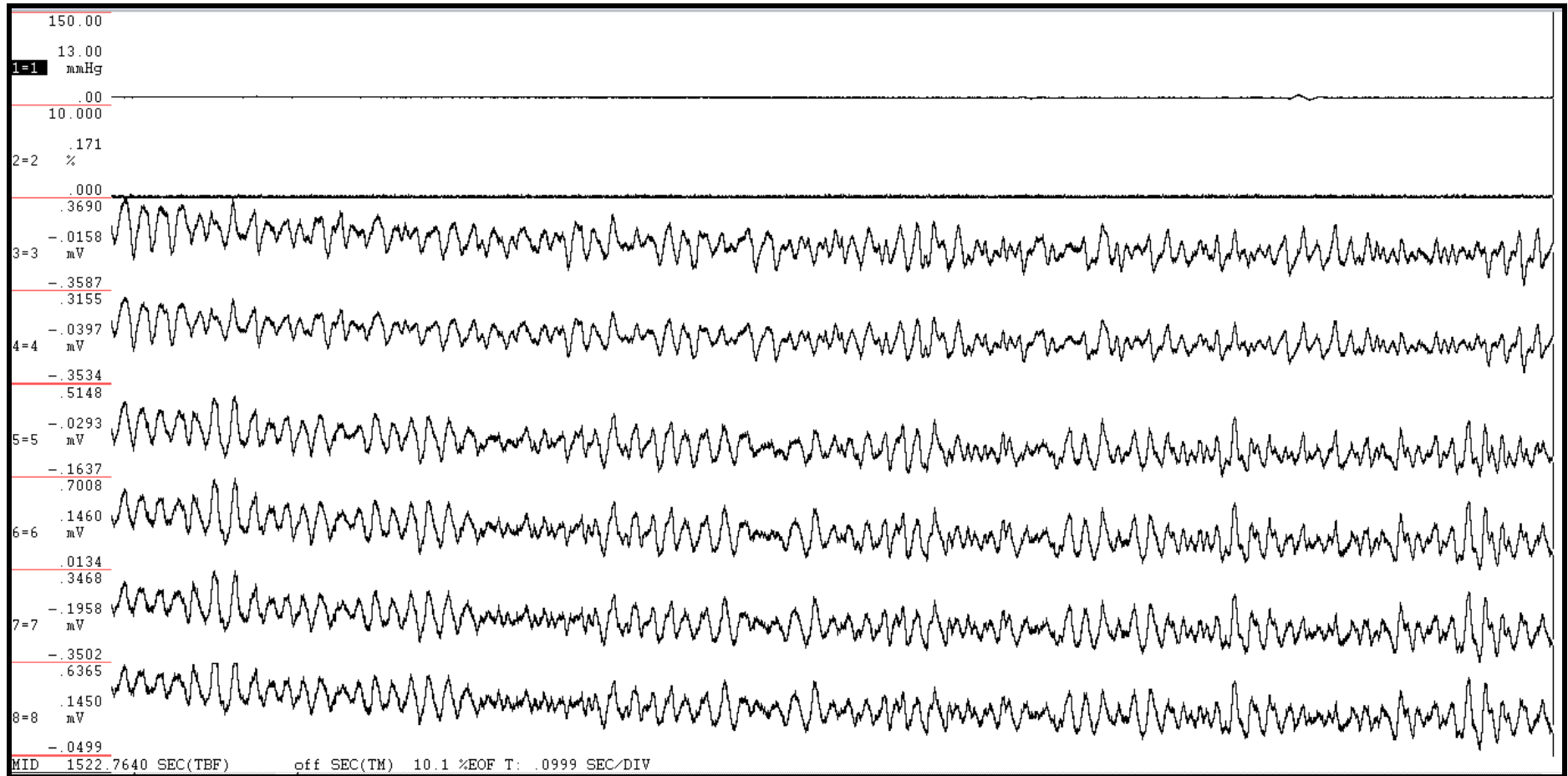


Figura 9: Traçado dos sinais de pressão arterial (PA), CO2 corrente e eletrocardiograma nas derivações precordiais V1 a V6 de um animal representativo do grupo infartado tratado com salina (Inf-Sal) evidenciando um período prolongado de fibrilação ventricular, o qual provocou o óbito do animal.

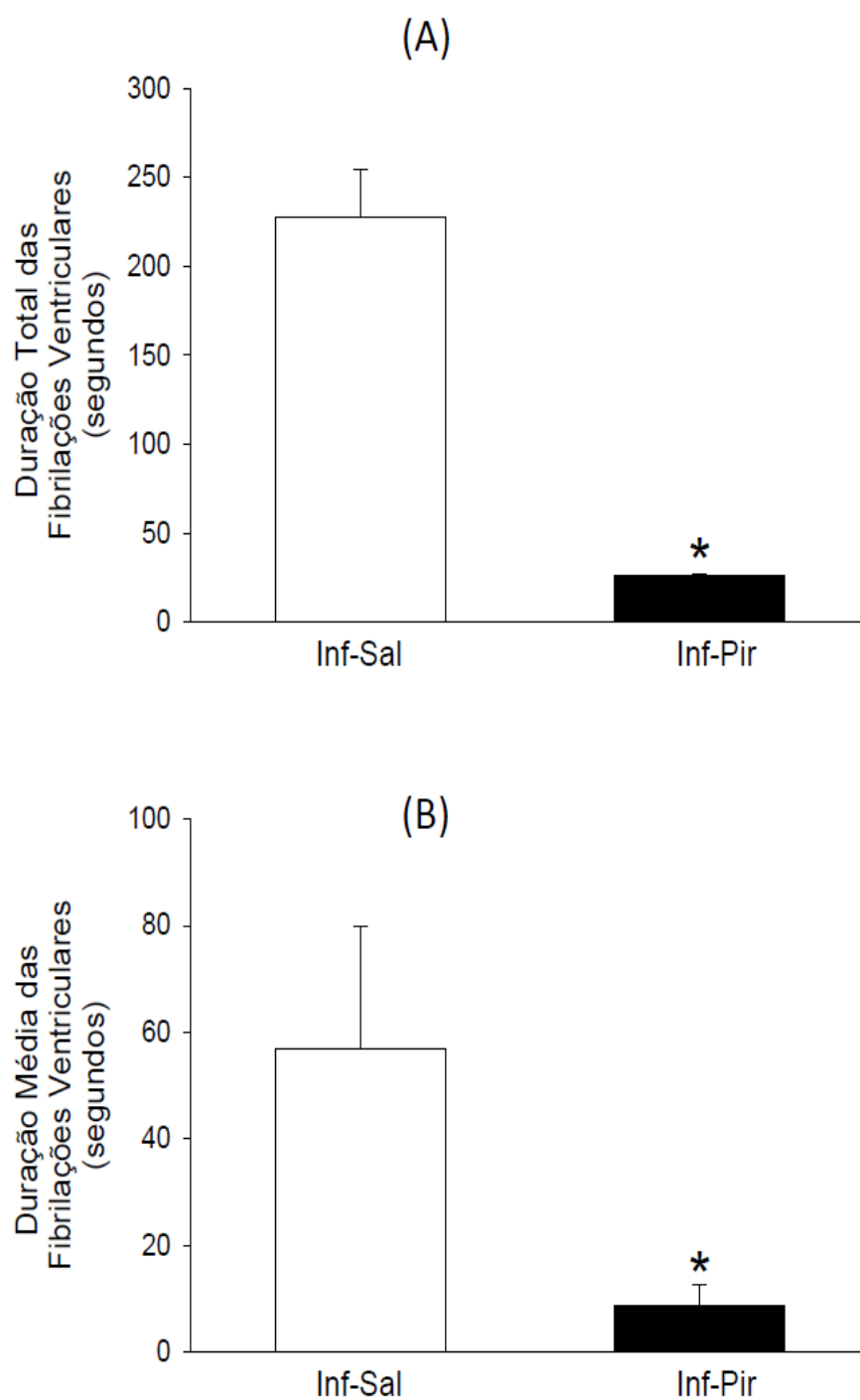


Figura 10: (Painel A): Valores médios (\pm EPM) da duração total de fibrilação ventricular (em segundos). (Painel B): e da duração média de fibrilação ventricular (em segundos). * $p < 0,05$ versus grupo Inf-Sal.

Episódios de bradicardia, seja por bloqueios atrioventriculares de segundo ou terceiro grau (total) ou bradicardia sinusal severa (figura 11) foram observados em 4 (40%) animais do grupo infartados recebendo salina, sendo um deles associado ao evento fatal, e em 4 (40%) dos animais infartados tratados com brometo de piridostigmina. Nestes animais nenhum evento de bradicardia foi associado a evento fatal. A duração total dos eventos de bradicardia tendeu a ser maior nos animais infartados tratados com brometo de piridostigmina ($31,7 \pm 10,9$ s versus $13,9 \pm 4,5$ s nos animais Inf-Sal, $p=0,183$), enquanto que a duração média foi similar entre os dois grupos ($6,5 \pm 2,6$ s no grupo Inf-Pir e $7,3 \pm 2,5$ s no grupo Inf-Sal) (Figura 12).

Após a quantificação da pontuação dos eventos arrítmicos globais para cada animal em ambos os grupos infartados, verificou-se que o tratamento com o brometo de piridostigmina levou a uma significativa redução da pontuação total de arritmia ($2,2 \pm 0,3$ versus $3,7 \pm 0,5$ no grupo Inf-Sal, $p < 0,05$) (Figura 13).

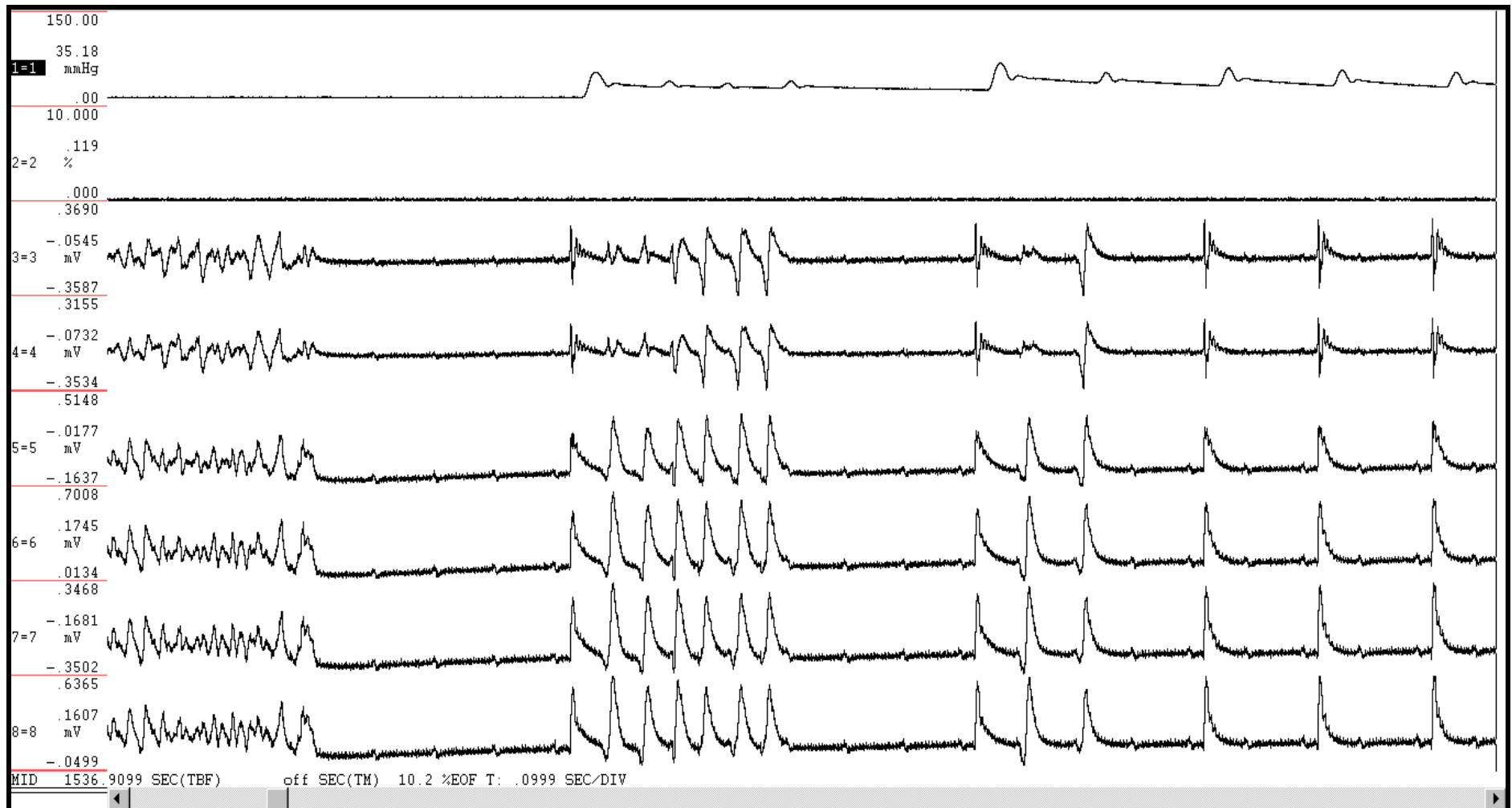


Figura 11: Traçado dos sinais de pressão arterial (PA), CO₂ corrente e eletrocardiograma nas derivações precordiais V1 a V6 de um animal representativo do grupo infartado tratado com salina (Inf-Sal) evidenciando um período de bradicardia por bloqueio átrio-ventricular do segundo grau, logo após a reversão espontânea de uma fibrilação ventricular.

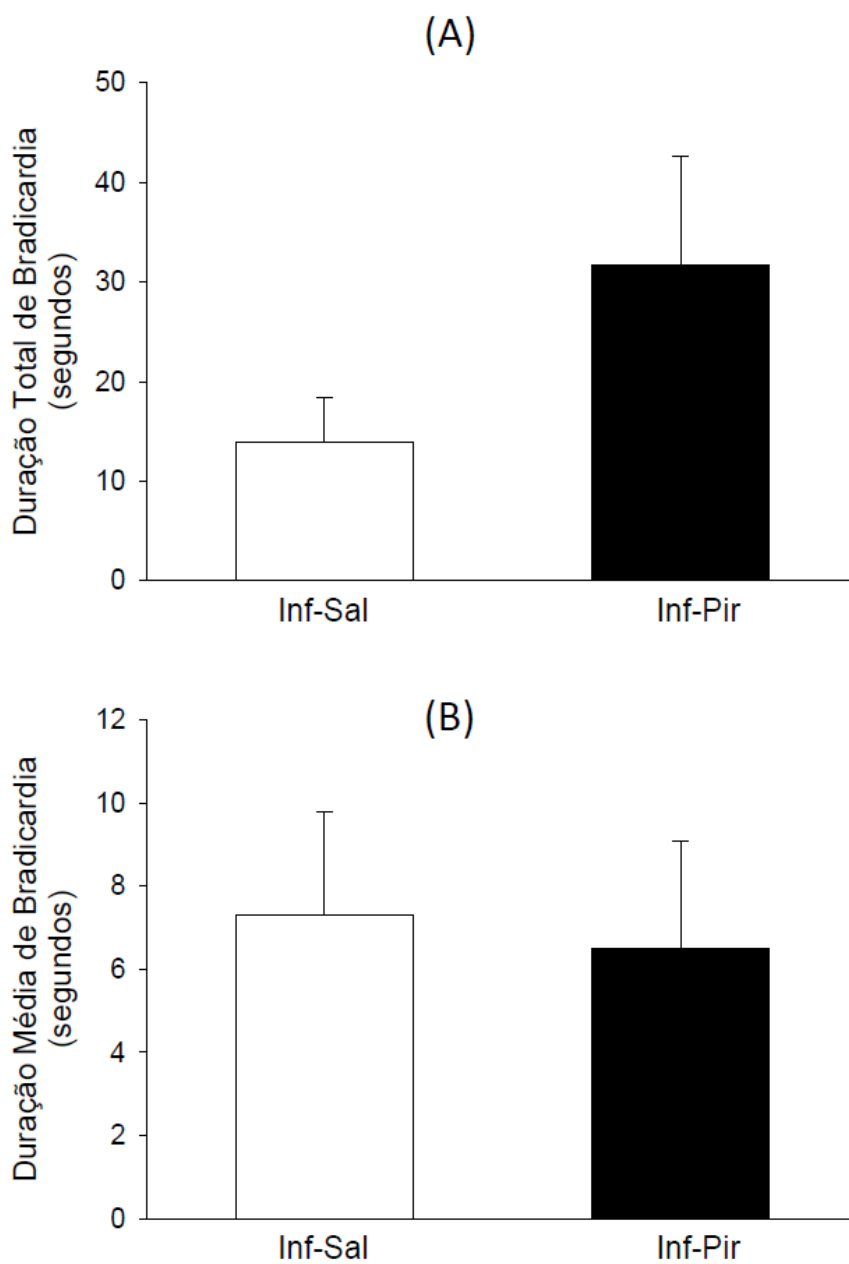


Figura 12: Valores médios (\pm EPM) da duração total de bradicardia (em segundos) (Painel A) e da duração média de bradicardia (em segundos) (Painel B).

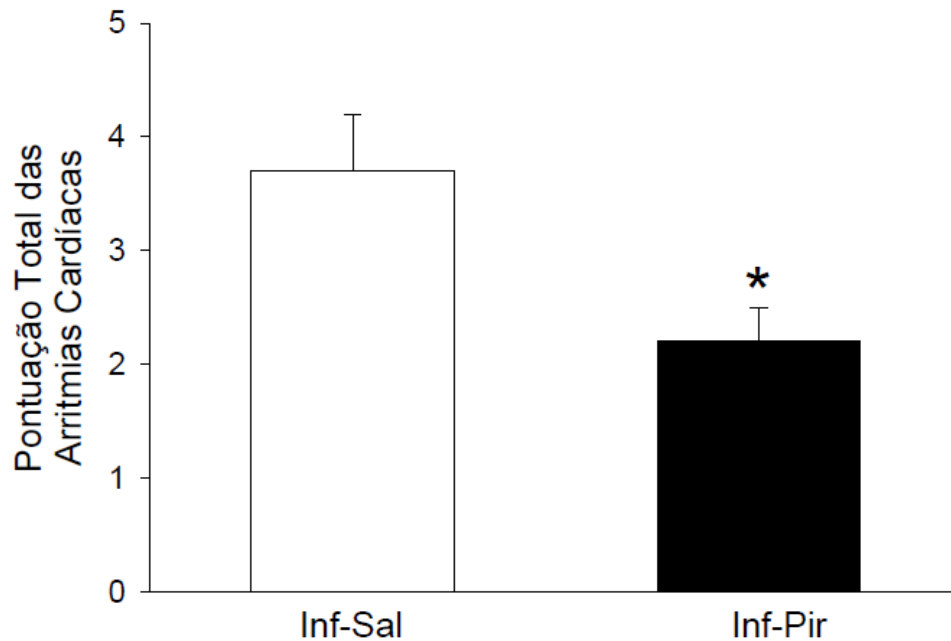


Figura 13: Valores médios (\pm erro padrão) da pontuação total de arritmias cardíacas nos grupos Inf-sal e Inf-Pir. ($p < 0,05$ versus Inf-Sal).

4.3.4. Tamanho do Infarto Agudo do Miocárdio

O tamanho do infarto do miocárdio logo após a morte espontânea ou à eutanásia ao final das 04 horas de observação foi quantificado pelo método de perfusão com azul de Evans em 4 corações que vieram a óbito antes das 3 horas de oclusão da artéria coronária ou pelo método da incubação em TTC em 16 corações processados após três horas do infarto (Figura 14). O tamanho do infarto no grupo tratado com brometo de piridostigmina ($53,2 \pm 3,9\%$) não diferiu daquele medido nos animais infartados que receberam salina ($56,6 \pm 2,8$, $p =$ não significativo). A transmuralidade do infarto medido pela razão comprimento epicárdico infartado/comprimento endocárdico infartado no grupo Inf-Pir ($1,35 \pm 0,04$) também não diferiu do grupo Inf-Sal ($1,34 \pm 0,03$, $p =$ não significativo) (Figura 14).

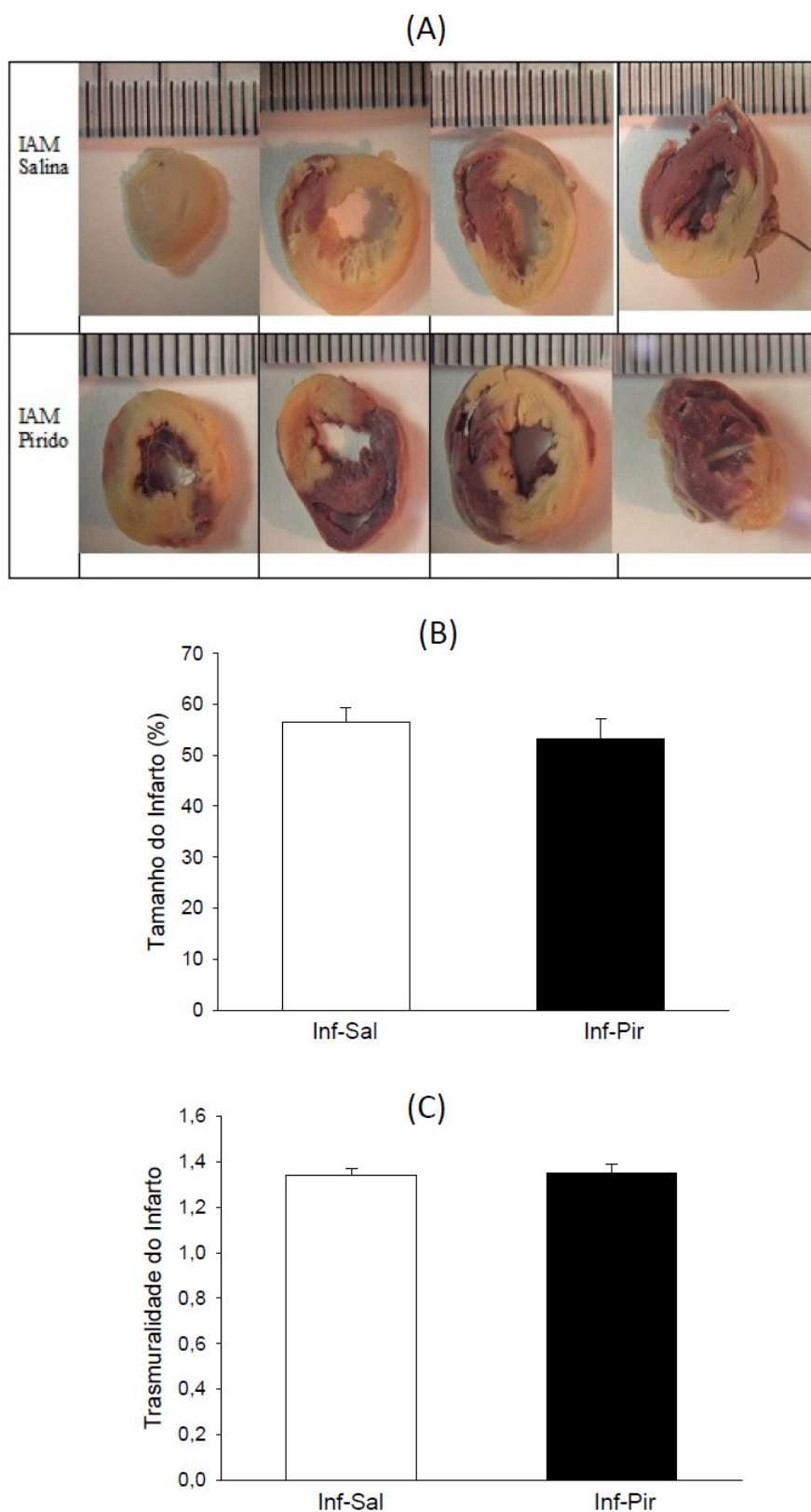


Figura 14: (Painel A): Cortes de coração infartado incubados com TTC a fim de quantificar o tamanho da área cardíaca infartada (coloração pálida) em relação ao miocárdio não-infartado (coloração avermelhada pela impregnação do TTC) nos animais tratados com brometo de piridostigmina ou salina. (Painel B): Tamanho do infarto (em % do perímetro cardíaco). (Painel C): Transmuralidade.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra pela primeira vez que a administração endovenosa em bolos repetidos de brometo de piridostigmina, um agente anticolinesterásico, em ratos com infarto agudo miocárdio induzido por oclusão da artéria coronária descendente anterior promove proteção miocárdica, reduzindo significativamente a incidência de arritmias complexas com forte tendência de aumento da sobrevivência dos animais nas primeiras quatro horas de tratamento. Tais efeitos foram acompanhados de bradicardia sinusal leve a moderada, de início imediato e estável associado a leve hipotensão arterial sistêmica a partir da segunda hora de tratamento. O tratamento não modificou a extensão da área infartada. Ainda que os possíveis mecanismos moleculares deste efeito não tenham sido explorados neste trabalho, tais resultados confirmam e ampliam dados anteriores da literatura, abrindo uma enorme perspectiva de possível uso clínico futuro deste fármaco como terapia adjuvante no tratamento do infarto agudo miocárdio em seres humanos.

Tendo em vista que o possível efeito do brometo de piridostigmina deve envolver uma modificação no balanço autonômico do coração, com uma potenciação da atividade vagal parassimpática e uma redução da atividade simpática cardíaca (Soares et al., 2004), o uso de anestésicos poderia mascarar os eventuais efeitos autonômicos do brometo de piridostigmina nos animais anestesiados, como já atestado por inúmeros trabalhos anteriores (Maggi e Meli, 1986; Carruba et al., 1987). Entretanto, nas doses empregadas, e em ratos normais não infartados, o brometo de piridostigmina injetado endovenosamente em 2 a 4 bolos foi capaz de induzir uma bradicardia sinusal leve a moderada (10-15%) e mantida ao longo das 4 horas de estudo. Esta bradicardia não foi associada à hipotensão arterial e nem a modificações respiratórias. Tais achados confirmam aqueles encontrados por Santos-Almeida et al. (2014), em ratos normais não infartados anestesiados, em que uma única dose endovenosa em bolos induziu também uma leve bradicardia sinusal sem hipotensão arterial, a qual durou por cerca

de 1-2horas (Santos-Almeida et al., 2014). Em nosso protocolo, entretanto, devido à repetição de um a três bolos adicionais, a bradicardia sinusal se manteve estável ao longo de todo o período de registro de 4 horas. Embora no presente trabalho, não tenha sido executado nenhum teste para demonstrar os efeitos autonômicos diretos do brometo de piridostigmina aumentando a atividade parassimpática vagal e eventualmente reduzindo a atividade simpática cardíaca, a bradicardia sinusal observada fortemente sugere tal efeito, como demonstrado por Santos-Almeida et al. (2014), em protocolo similar com injeção de único bolo. Em adição, o brometo de piridostigmina não parece ter efeitos diretos independentes do sistema nervoso autônomo no nó sinusal nem de ratos e nem de seres humanos (Zimmerman et al., 2010, Almeida-Santos et al., 2014). Tendo em mente um eventual uso clínico futuro da piridostigmina endovenosa, a mesma não induziu, além da bradicardia sinusal, nenhuma outra arritmia cardíaca ou alteração hemodinâmica ou respiratória significativa, sugerindo que a mesma, nas doses administradas, parece ser segura.

Nos animais infartados, a administração de brometo de piridostigmina em regime de injeção em bolos repetidos também foi capaz de induzir uma imediata bradicardia sinusal, de 15-20% de redução da FC em relação à frequência cardíaca basal, estável ao longo das 4 horas de observação. Curiosamente, tal bradicardia foi atingida com doses significativamente menores de brometo de piridostigmina. Não encontramos nada na literatura que pudesse ser usado para explicar esta aparente maior sensibilidade do coração infartado aos efeitos autonômicos do brometo de piridostigmina. Como os animais infartados apresentavam uma significativa taquicardia sinusal de base antes do tratamento, sugestiva de uma hiperatividade simpática e de uma inibição vagal, já há muito descrito neste contexto (Casolo et al., 1992; Graham et al., 2002), é possível que esta maior sensibilidade ao brometo de piridostigmina possa estar associada uma hipersensibilidade aguda dos receptores muscarínicos M2, via “up-regulation” ou modificação pós-transcricional após o infarto. De fato, em outros contextos

cardiovasculares que não o infarto do miocárdio, a maquinaria colinérgica cardíaca é estimulada (“up-regulated”) em situações de hiperatividade adrenérgica (Gavioli et al., 2014).

Vale aqui ressaltar que, diferentemente dos animais normais não infartados, o brometo de piridostigmina provocou nos animais infartados, ao final de cerca de duas horas, uma leve, porém, significativa hipotensão arterial sistêmica. Esta hipotensão poderia estar relacionada à perda de massa miocárdica contrátil decorrente do infarto, dificultando o coração de compensar a bradicardia sinusal observada por meio do acionamento do mecanismo de Frank-Starling, o qual se encontra prejudicado no coração infartado (Ertl et al., 1991). Estudos adicionais são necessários para esclarecer melhor este ponto.

Diferentemente do trabalho publicado por Santos-Almeida et al. (2014), o tratamento com o brometo de piridostigmina não foi capaz de reduzir a incidência de extrassístoles ventriculares em nossos animais infartados. As razões para este resultado contrastante não são conhecidas, mas podemos especular que talvez a diferença decorra do distinto regime de administração (múltiplos bolos versus bolo único) e da maior dose total (0,54mg/Kg em média versus 0,25mg/Kg), com uma bradicardia mais duradoura. Nesta situação, ainda que a ativação parassimpática vagal e/ou inibição simpática cardíaca pudessem estar inibindo eventuais focos ectópicos ou atividades disparadas, o aumento do período responsivo livre decorrente da bradicardia, poderia estar permitindo uma maior manifestação elétrica dos focos ectópicos, mascarando assim um eventual efeito protetor do brometo de piridostigmina contra as extrassístoles.

Porém, em relação às arritmias complexas e ameaçadoras de vida, como a taquicardia ventricular, o flutter ventricular e a fibrilação ventricular, cuja fisiopatogênese está mais relacionada ao fenômeno da reentrada ou à heterogeneidade de repolarização (Yan et al., 2003), o tratamento com o brometo de piridostigmina tendeu a reduzir ou foi efetivo em reduzir a manifestação das mesmas, ao longo das quatro horas de observação. No trabalho

recentemente publicado por Santos-Almeida et al. (2014), os autores não mencionam os efeitos de uma única dose do brometo de piridostigmina sobre estas arritmias complexas no contexto do infarto agudo do miocárdio em ratos. Assim sendo, para o nosso conhecimento, este é o primeiro relato dos efeitos cardioprotetores do brometo de piridostigmina sobre as arritmias graves induzidas pelo infarto agudo do miocárdio. Trabalhos anteriores em seres humanos têm demonstrado efeitos antiarrítmicos do brometo de piridostigmina em outros contextos de doenças cardiovasculares (Behling et al., 2003; Zimmerman et al., 2010).

As possíveis razões para este efeito elétrico benéfico não são conhecidas, mas podem envolver uma série de mecanismos moleculares já descritos principalmente no contexto da estimulação elétrica vagal cardíaca. Por exemplo, a estimulação vagal preservou a forma fosforilada da conexina 43 (Cx43), o principal subtipo de proteína das junções gap nos ventrículos. A preservação da conexina 43 manteve o acoplamento elétrico, fundamental na manutenção da estabilidade elétrica, evitando a heterogeneidade de repolarização e retardo na condução, que ocorrem durante a isquemia (Ando et al., 2005). Tal efeito sobre a conexina-43 foi também recentemente descrito por Santos-Almeida et al. (2014), em que o brometo de piridostigmina foi capaz de reverter a redução de expressão de conexina-43 observada em ratos infartados.

A estimulação colinérgica vagal também inibe o processo apoptótico na isquemia do miocárdio. A possível explicação seria a ativação da via PI3k/Akt/HIF1 α intracelular. Isso reforça a evidência que a acetilcolina tem um efeito protetor sobre os cardiomiócitos de rato sujeitos a hipóxia/ normóxia por aumentar a fosforilação da Akt e evitar a apoptose produzida por hipóxia e o colapso do potencial de membrana mitocondrial (Kakinuma et al., 2005).

No estudo realizado por Katare e colaboradores (2009), estimulação elétrica do nervo vago teve um efeito cardioprotetor, após período de isquemia, reduzindo o tamanho do infarto independente da frequência cardíaca e preservando a função mitocondrial por bloquear a

abertura do PTP (Poro de Transição de Permeabilidade) mitocondrial. A abertura prolongada do PTP leva a morte celular através da rápida depleção de ATP e ativação de mensageiros de morte celular, tais como as caspases. Nesse estudo, a estimulação vagal induziu a fosforilação da Akt e Bad, que são importantes fatores pré-mitocondriais de sobrevivência celular. A fosforilação de Bad impediu sua translocação para mitocôndria e ligação com Bcl2 (gene anti-apoptótico), o que é essencial para manter o PTP fechado. A estimulação vagal também inibiu a liberação mitocondrial do citocromo c no citosol e ativação da caspase-3. Esses resultados demonstram que a estimulação vagal é capaz de inibir as três fases da morte celular por apoptose (Katare et al., 2009). Tais efeitos anti-apoptóticos poderiam preservar cardiomiócitos na zona de borda do infarto, onde a maioria dos eventos reentrantes e a heterogeneidade de repolarização se manifestam (Yan et al., 2003).

Um possível outro mecanismo molecular, recentemente descrito, e que não poderia deixar de ser mencionado, relaciona-se a uma possível potenciação do sistema colinérgico próprio do miocárdio (Rana et al., 2010; Rocha-Resende et al., 2012; Roy et al., 2013), promovido pelo brometo de piridostigmina. Tal sistema colinérgico intracardíaco potenciado poderia estar contribuindo para os efeitos antiarrítmicos do brometo de piridostigmina aqui descritos. Entretanto, experimentos adicionais necessitam ser efetuados a fim de testar esta hipótese.

Como consequência dos efeitos cardioprotetores e antiarrítmicos, observamos no presente estudo uma forte tendência ($p=0,081$) de elevação da taxa de sobrevivência dos animais infartados tratados, ainda que a extensão da área infartada não tenha sido reduzida. É possível que esta tendência se torne significativa pelo aumento do tamanho amostral nos dois grupos estudados, o qual por seu número relativamente pequeno constitui-se na principal limitação deste estudo.

Entretanto, apesar destas limitações, nossos resultados sugerem fortemente que o tratamento com o brometo de piridostigmina pode ser efetivo em prevenir o principal desfecho almejado para qualquer tratamento, ou seja, a redução de mortalidade. Estudos adicionais fazem-se necessários em espécies animais maiores e mesmo em seres humanos para a confirmação deste importante resultado.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra pela primeira vez que a administração endovenosa em bolos repetidos de brometo de piridostigmina, um agente anticolinesterásico, em ratos com infarto agudo miocárdio promove proteção miocárdica, reduzindo significativamente a incidência de arritmias complexas com forte tendência de aumento da sobrevida dos animais, apesar da não modificação na extensão da área infartada. Tais efeitos foram acompanhados de bradicardia sinusal leve a moderada associada a leve hipotensão arterial sistêmica. Ainda que os possíveis mecanismos moleculares deste efeito não tenham sido explorados neste trabalho, tais resultados confirmam e ampliam dados anteriores da literatura, abrindo uma enorme perspectiva de possível uso clínico futuro deste fármaco como terapia adjuvante no tratamento do infarto agudo miocárdio em seres humanos.

REFERÊNCIAS

- Ando M, Katare RG, Kakinuma Y, Zhang D, Yamasaki F, Muramoto K, Sato T. Efferent vagal nerve stimulation protects heart against ischemia-induced arrhythmias by preserving connexin43 protein. *Circulation*. 2005 Jul 12; 112(2):164-70. Epub 2005 Jul 5.
- Androne AS, Hryniewicz K, Goldsmith R, Arwady A, Katz SD. Acetylcholinesterase inhibition with pyridostigmine improves heart rate recovery after maximal exercise in patients with chronic heart failure. *Heart* 2003, Aug; 89(8): 854-8.
- Au TL, Collins GA, Harvie CJ, Walker MJ. The actions of prostaglandins I₂ and E₂ on arrhythmias produced by coronary occlusion in the rat and dog. *Prostaglandins*. 1979 Nov; 18(5): 707-20.
- Aubert AE, Seps B, Beckers F. Heart rate variability in athletes. *Sports Med*. 2003; 33(12): 889-919.
- Behling A, Moraes RS, Rohde LE, Ferlin EL, Nóbrega AC, Ribeiro JP. Cholinergic stimulation with pyridostigmine reduces ventricular arrhythmia and enhances heart rate variability in heart failure. *Am Heart J* 2003, Sep; 146(3):494-500.
- Bibeovski S, Dunlap ME. Ganglionic mechanisms contribute to diminished vagal control in heart failure. *Circulation* 1999, Jun 8; 99 (22):2958-63.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Datasus. Informações de Saúde. Estatísticas vitais – Mortalidade e Nascidos Vivos 2011. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>>. Acesso em: fevereiro 2014.
- Carruba MO, Bondiolotti G, Picotti GB, Catteruccia N, Da Prada M. Effects of diethyl ether, halothane, ketamine and urethane on sympathetic activity in the rat. *Eur J Pharmacol*. 1987 Jan 28; 134(1):15-24.
- Casadei B, Pipilis A, Sessa F, Conway J, Sleight P. Low doses of scopolamine increase cardiac vagal tone in the acute phase of myocardial infarction. *Circulation*. 1993 Aug; 88(2):353-7.
- Casolo GC, Stroder P, Signorini C, Calzolari F, Zucchini M, Balli E, Sulla A, Lazzerini S. Heart rate variability during the acute phase of myocardial infarction. *Circulation*. 1992 Jun; 85(6):2073-9.
- Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev*. 1998 Jun; 50(2):279-90. Review.
- De Ferrari GM, Crijns HJ, Borggrefe M, Milasinovic G, Smid J, Zabel M, Gavazzi A, Sanzo A, Dennert R, Kuschyk J, Raspopovic S, Klein H, Swedberg K, Schwartz PJ; CardioFit Multicenter Trial Investigators. Chronic vagus nerve stimulation: a new and promising therapeutic approach for chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2011 Apr; 32(7):847-55.

- Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. *Experimental studies in rats. Cardiovasc Res.* 2002 Aug 1;55(2):329-40.
- Durand MT, Becari C, de Oliveira M, do Carmo JM, Silva CA, Prado CM, Fazan R Jr, Salgado HC. Pyridostigmine restores cardiac autonomic balance after small myocardial infarction in mice. *PLoS One.* 2014 Aug 18; 9(8)
- Eisenhofer G, Friberg P, Rundqvist B, Quyyumi AA, Lambert G, Kaye DM, Kopin IJ, Goldstein DS, Esler MD. Cardiac sympathetic nerve function in congestive heart failure. *Circulation.* 1996 May 1;93(9):1667-76.
- Ertl G, Frantz S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2005, 66: 22-32.
- Ertl G, Gaudron P, Eilles C, Schorb W, Kochsiek K. Compensatory mechanisms for cardiac dysfunction in myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 1991; 86 Suppl 3:159-65.
- Ferrari AU, Daffonchio A, Franzelli C, Mancia G. Cardiac parasympathetic hyperresponsiveness in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1992, Jun; 19 (6 Pt 2):653-7.
- Gavioli M, Lara A, Almeida PW, Lima AM, Damasceno DD, Rocha-Resende C, Ladeira M, Resende RR, Martinelli PM, Melo MB, Brum PC, Fontes MA, Souza Santos RA, Prado MA, Guatimosim S. Cholinergic signaling exerts protective effects in models of sympathetic hyperactivity-induced cardiac dysfunction. *PLoS One.* 2014 Jul 3;9(7):e100179.
- Gaziano JM. Global burden of cardiovascular disease. In: Braunwald E, Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP (eds). *Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine.* 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008. p. 1-22.
- Goldstein JA, Lee DT, Pica MC, Dixon SR, O'Neill WW. Patterns of coronary compromise leading to bradyarrhythmias and hypotension in inferior myocardial infarction. *Coron Artery Dis.* 2005 Aug; 16(5):265-74.
- Graham LN, Smith PA, Stoker JB, Mackintosh AF, Mary DA. Time course of sympathetic neural hyperactivity after uncomplicated acute myocardial infarction. *Circulation.* 2002 Aug 13;106 (7):793-7.
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005 Apr 21; 352 (16):1685-95.
- Holmes JW, Borg TK, Covell JW. Structure and mechanics of healing myocardial infarcts. *Annu Rev Biomed Eng* 2005, 7: 223-53.
- Johnston KM, MacLeod BA, Walker MJ. Responses to ligation of a coronary artery in conscious rats and the actions of antiarrhythmics. *Can J Physiol Pharmacol.* 1983 Nov; 61(11):1340-53.
- Kandel ES, Hay N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res.* 1999 Nov 25; 253(1):210-29. Review.

Kakinuma Y, Ando M, Kuwabara M, Katare RG, Okudela K, Kobayashi M, Sato T. Acetylcholine from vagal stimulation protects cardiomyocytes against ischemia and hypoxia involving additive non-hypoxic induction of HIF-1 α . *FEBS Lett* 2005, Apr 11; 579 (10): 2111-8.

Kapliniski E, Ogawa S, Balke CW, Dreifus LS. Two periods of early ventricular arrhythmia in the canine acute myocardial infarction model. *Circulation*. 1979; 60:397-403.

Katare RG, Ando M, Kakinuma Y, Arikawa M, Handa T, Yamasaki F, Sato T. Vagal nerve stimulation prevents reperfusion injury through inhibition of opening of mitochondrial permeability transition pore independent of the bradycardiac effect. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009, Jan; 137 (1):223-31.

Kobayashi M, Massiello A, Karimov JH, Van Wagoner DR, Fukamachi K. Cardiac autonomic nerve stimulation in the treatment of heart failure. *Ann Thorac Surg*. 2013 Jul; 96(1): 339-45. Review.

La Rovere MT, Pinna GD, Hohnloser SH, Marcus FI, Mortara A, Nohara R, Bigger JT Jr, Camm AJ, Schwartz PJ; ATRAMI Investigators. Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction. Baroreflex sensitivity and heart rate variability in the identification of patients at risk for life-threatening arrhythmias: implications for clinical trials. *Circulation* 2001, Apr 24; 103 (16):2072-7.

Lanas F, Avezum A, Bautista LE, Diaz R, Luna M, Islam S, Yusuf S; INTERHEART Investigators in Latin America. Risk factors for acute myocardial infarction in Latin America: the INTERHEART Latin American study. *Circulation*. 2007, Mar 6; 115 (9):1067-74.

Laturo RM, Silva CA, Fazan R Jr, Rossi MA, Prado CM, Godinho RO, Salgado HC. Increase in parasympathetic tone by pyridostigmine prevents ventricular dysfunction during the onset of heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013 Oct 15; 305(8):R908-16.

Li M, Zheng C, Sato T, Kawada T, Sugimachi M, Sunagawa K. Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. *Circulation*. 2004 Jan 6; 109(1):120-4. Epub 2003 Dec 8.

Maggi CA, Meli A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 1: General considerations. *Experientia*. 1986 Feb 15; 42(2):109-14.

Maggi CA, Meli A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 2: Cardiovascular system. *Experientia*. 1986 Mar 15; 42(3):292-7.

Maggi CA, Meli A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations. Part 3: Other systems and conclusions. *Experientia*. 1986 May 15;42(5):531-7.

Meredith IT, Eisenhofer G, Lambert GW, Dewar EM, Jennings GL, Esler MD. Cardiac sympathetic nervous activity in congestive heart failure. Evidence for increased neuronal norepinephrine release and preserved neuronal uptake. *Circulation* 1993, 88: 136-145.

Mill JG, Stefanon I, dos Santos L, Baldo MP. Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression for heart failure. *Braz J Med Biol Res* 2011, Sep; 44 (9):890-8. Epub 2011 Aug 5.

Northover BJ. Ventricular tachycardia during the first 72 hours after acute myocardial infarction. *Cardiology* 1982, 69: 149-156.

Opitz CF, Mitchell GF, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Arrhythmias and Death After Coronary Artery Occlusion in the Rat: Continuous Telemetric ECG Monitoring in Conscious, Untethered Rats. *Circulation* 1995, 92: 253-261.

Orcy RB, Schroeder S, Martins-Costa SH, Ramos JG, Schechinger W, Klein H, Brum IS, von Eye Corleta H, Capp E. Signalization of Akt/PKB in the placenta, skeletal muscle and adipose tissue of preeclampsia patients. *Gynecol Obstet Invest.* 2008; 66(4): 231-6.

Pesaro AE, Serrano CV Jr, Nicolau JC. [Acute myocardial infarction – acute coronary syndrome with ST-segment elevation]. *Rev Assoc Med Bras* 2004, Apr-Jun; 50(2):214-20.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol* 1991, 260: H1406-H1414.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979, 44: 503-512.

Piegas LS, Avezum A, Pereira JC, Neto JM, Hoepfner C, Farran JA, Ramos RF, Timerman A, Esteves JP; AFIRMAR Study Investigators. Risk factors for myocardial infarction in Brazil. *Am Heart J* 2003, Aug; 146 (2):331-8.

Piegas LS, Feitosa G, Mattos LA, Nicolau JC, Rossi Neto JM, Timerman A, et al; Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio com supradesnível do segmento ST. *Arq Bras Cardiol.* 2009; 93(6 supl. 2):e179-e264.

Pinho RA, Araújo MC, Ghisi GLM e Benetti M. Doença arterial coronariana, exercício físico e estresse oxidativo. *Arq Bras Cardiol* 2010, vol.94, n.4: 549-555.

Pontes MRN, Leães PE. Remodelamento ventricular: dos mecanismos moleculares e celulares ao tratamento. *Rev Soc Cardiol Rio Grande do Sul.* 2004; 13(3). Disponível em: <http://sociedades.cardiol.br/sbc-rs/revista/2004/03/artigo11.pdf>

Rana OR, Schauerte P, Kluttig R, Schröder JW, Koenen RR, Weber C, Nolte KW, Weis J, Hoffmann R, Marx N, Saygili E. Acetylcholine as an age-dependent non-neuronal source in the heart. *Auton Neurosci.* 2010 Aug 25; 156(1-2):82-9.

Richtsfeld M, Yasuhara S, Fink H, Blobner M, Martyn JA. Prolonged administration of pyridostigmine impairs neuromuscular function with and without down-regulation of acetylcholine receptors. *Anesthesiology* 2013, Aug; 119(2):412-21.

Rocha-Resende C, Roy A, Resende R, Ladeira MS, Lara A, de Moraes Gomes ER, Prado VF, Gros R, Guatimosim C, Prado MA, Guatimosim S. Non-neuronal cholinergic machinery present in cardiomyocytes offsets hypertrophic signals. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 Aug; 53(2):206-16.

Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 Jan 14; 340(2):115-26.

Ruff CT, Braunwald E. The evolving epidemiology of acute coronary syndromes. *Nat Rev Cardiol* 2011, Mar; 8 (3):140-7.

Roy A, Fields WC, Rocha-Resende C, Resende RR, Guatimosim S, Prado VF, Gros R, Prado MA. Cardiomyocyte-secreted acetylcholine is required for maintenance of homeostasis in the heart. *FASEB J.* 2013 Dec;27(12):5072-82.

Sabino JP, da Silva CA, de Melo RF, Fazan R Jr, Salgado HC. The treatment with pyridostigmine improves the cardiocirculatory function in rats with chronic heart failure. *Auton Neurosci.* 2013 Jan; 173(1-2):58-64.

Santos-Almeida FM, Girao H, Silva CA, Salgado HC Becari, Fazan R Jr. Cholinergic stimulation with pyridostigmine protects myocardial infarcted rats against ischemic-induced arrhythmias and preserves connexin 43 protein. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014 Nov 21:ajpheart.00591.2014.

Selye H, Bajusz E, Grasso S, Mendell P. Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology.* 1960 Oct; 11: 398-407.

Soares PP, da Nóbrega AC, Ushizima MR, Irigoyen MC. Cholinergic stimulation with pyridostigmine increases heart rate variability and baroreflex sensitivity in rats. *Auton Neurosci* 2004, Jun 30;113 (1-2):24-31.

Simonis G, Wiedemann S, Schwarz K, Christ T, Sedding DG, Yu X, Marquetant R, Braun-Dullaeus RC, Ravens U, Strasser RH. Chelerythrine treatment influences the balance of pro- and anti-apoptotic signaling pathways in the remote myocardium after infarction. *Mol Cell Biochem.* 2008 Mar; 310(1-2):119-28.

Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med.* 2005 Jan-Mar; 9(1):59-71. Review.

Taggart P, Sutton P, Chalabi Z, Boyett MR, Simon R, Elliott D, Gill JS. Effect of adrenergic stimulation on action potential duration restitution in humans. *Circulation.* 2003 Jan 21; 107(2):285-9.

Thygesen K, Alpert J S e White HD, for the joint ESC/ACCF/ AHA/ WHF Task force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. *Eur. Heart j* 2007, 28: 2525-2538.

Uemura K, Zheng C, Li M, Kawada T, Sugimachi M. Early short-term vagal nerve stimulation attenuates cardiac remodeling after reperfused myocardial infarction. *Card Fail.* 2010 Aug; 16(8):689-99.

Van de Werf F, Ardissimo D, Betriu A, Cokkinos DV, Falk E, Fox KA, et al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. ESC task-force report. *Eur Heart J* 2003, 24:28-66.

Vandervelde S, van Luyn MJ, Rozenbaum MH, Petersen AH, Tio RA, Harmsen MC. Stem cell-related cardiac gene expression early after murine myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2007, Mar 1; 73 (4):783-93. Epub 2006 Nov 29.

Vaseghi M, Shivkumar K. The role of the autonomic nervous system in sudden cardiac death. *Prog Cardiovasc Dis*. 2008 May-Jun; 50(6):404-19. Review.

Wang H, Han H, Zhang L, Shi H, Schram G, Nattel S, Wang Z. Expression of multiple subtypes of muscarinic receptors and cellular distribution in the human heart. *Mol Pharmacol*. 2001 May; 59(5): 1029-36.

Waxman MB, Cupps CL, Cameron DA. Modulation of an idioventricular rhythm by vagal tone. *J Am Coll Cardiol* 1988, May; 11(5):1052-60.

Wit AL, Janse MJ. Delayed ventricular arrhythmias in the subacute phase of myocardial infarction. In: Wit AL, Janse MJ, eds. *The Ventricular Arrhythmias of Ischemia and Infarction: Electrophysiological Mechanisms*. Mount Kisco, NY: Futura Publishing Co; 1993:267-337.

Yan GX, Lankipalli RS, Burke JF, Musco S, Kowey PR. Ventricular repolarization components on the electrocardiogram: cellular basis and clinical significance. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Aug 6; 42(3):401-9

Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L; INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004, Sep 11-17; 364(9438): 937-52.

Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Wilcox JN, Shearer S, Ronson RS, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res*. 2000 Feb; 45(3):651-60.

Zimmerman LI, Liberman A, Castro RR, Ribeiro JP, Nóbrega AC. Acute electrophysiologic consequences of pyridostigmine inhibition of cholinesterase in humans. *Braz J Med Biol Res*. 2010 Feb; 43(2):211-6.

Zimetbaum PJ, Josephson ME. Use of the electrocardiogram in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003, Mar 6; 348(10): 933-40.

Zipes DP, Rubart M. Neural modulation of cardiac arrhythmias and sudden cardiac death. *Heart Rhythm*. 2006 Jan; 3(1):108-13. Review.

Zipes DP. Epidemiology and mechanisms of sudden cardiac death. *Can J Cardiol* 2005, May; 21 Suppl A: 37A-40A.