
**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Fisiologia**

**EFEITO DA INIBIÇÃO AGUDA DA ACETILCOLINESTERASE
COM PIRIDOSTIGMINA NA HEMODINÂMICA E
ELETROCARDIOGRAMA DE RATOS INFARTADOS**

Fernanda Machado dos Santos

**Ribeirão Preto
2014**

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Fisiologia**

**EFEITO DA INIBIÇÃO AGUDA DA ACETILCOLINESTERASE COM
PIRIDOSTIGMINA NA HEMODINÂMICA E ELETROCARDIOGRAMA DE
RATOS INFARTADOS**

Fernanda Machado dos Santos

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Fisiologia da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para obtenção do grau de
doutor em Ciências.**

Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Fazan Junior

**Ribeirão Preto
2014**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos , Fernanda Machado dos

Efeito da inibição aguda da acetilcolinesterase com piridostigmina na hemodinâmica e eletrocardiograma de ratos infartados. Ribeirão Preto: USP, 2014.

117 p. il., 30cm.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de doutor em Ciências. Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Fazan Junior

Folha de Aprovação

Aluno: Fernanda Machado dos Santos

Título: Efeito da inibição aguda da acetilcolinesterase com piridostigmina na hemodinâmica e eletrocardiograma de ratos infartados.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais, Sérgio e Clara, com amor e minha eterna gratidão.

“Nenhuma descoberta poderia interessar-me, por mais útil e importante que fosse, se eu tivesse que ser o único a lucrar com ela. Se me derem a sabedoria com a condição de que eu a guarde para mim sem poder transmiti-la, eu a recusarei”

(Sêneca)

Agradecimentos

- ❖ Ao professor Dr. Rubens Fazan pela brilhante orientação;
- ❖ Ao técnico Carlos Alberto A.Silva pela amizade e apoio na execução de alguns experimentos;
- ❖ À amiga Dra.Renata Maria Lataro por ter me ensinado a técnica da ligadura coronariana;
- ❖ Ao professor Dr. Helio Cesar Salgado, pelo apoio quando precisei;
- ❖ Ao técnico Rubens Fernando de Melo por ter me auxiliado na manipulação dos corações no laboratório de histologia;
- ❖ Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Fisiologia: Elisa, Fernandinho e especialmente à Claudia, por sua especial dedicação aos alunos do departamento;
- ❖ Aos funcionários do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da FMRP pela dedicação prestada aos animais utilizados no estudo;
- ❖ À Maria Luiza por seus cafés e chás que tornaram nossas manhãs e tardes mais aprazíveis;
- ❖ Ao professor Dr. Celso Rodrigues Franci por ter emprestado alguns equipamentos do seu laboratório;
- ❖ Aos docentes da Pós-graduação em Fisiologia pelos ensinamentos;
- ❖ Ao professor Dr. Henrique Girão pela coorientação prestada durante meu doutorado sanduíche na Faculdade de Medicina de Coimbra-Portugal, onde fui muito bem acolhida e assistida;
- ❖ Aos colegas do laboratório de Portugal: Ana Pinheiro, Ana Soares, Carla Marques, João Ferreira, Teresa Rodrigues, Maria Inês, Inês Mahú, Tânia

Marques, Rui Baptista, Diana Silva, Hugo Fôfo, Joana Correa e Rosa.

- ❖ Aos colegas do laboratório: Jaci Castania, Mauro de Oliveira, Renata Lataro, Daniel Dias, Marina Durand, Sharon Morais, Christiane Becari, Geisa Tezini, Gean Domingos, Sarai de Oliveira, Tomás Texeira, Wesley Correa e Pedro.
- ❖ Aos colegas do Departamento por tornarem os dias mais engraçados: João Paulo Sabino, Paula Santos, Victor Santos, Eduardo Umeoka, Glauber da Silva, Marcelo Kwiatkoski, Dawit Albieiro, Carlos Eduardo Almado, André Dagostin, Pedro Cedraz e Karina Maida.
- ❖ Às companheiras da minha moradia em Ribeirão, Mariana e Camila, pela feliz e agradável convivência.
- ❖ À minha avó Teresinha Góis Machado, *in memoriam*, que incrustou sua sabedoria em meus atos;
- ❖ Ao meu irmão, Sérgio Junior, por ter sanado muitas das minhas dúvidas na área da cardiologia, e à minha cunhada Thaís, pela torcida, sempre.
- ❖ À minha irmã Lorena, por mesmo distante saber fazer meus dias ficarem mais alegres;
- ❖ Ao meu noivo Márcio Lino, pelo apoio, pelas conversas construtivas e pelo companheirismo durante todo meu doutorado;
- ❖ Às amigas de Maceió, Michelle, Kyzia e Clarissa, por nutrirem nossa amizade por tantos anos apesar da distância;
- ❖ A todos aqueles que certamente esqueci-me de citar, mas que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional durante todos estes anos de doutorado, meu muito obrigada!

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES.

Resumo

O infarto do miocárdio (IM), uma das principais causas de morte nas sociedades industrializadas, é sempre acompanhado por uma notável alteração da modulação autonômica, caracterizada por hiperatividade simpática e diminuição do tono parassimpático ao coração. O bloqueio da atuação do simpático cardíaco tem sido amplamente utilizado como estratégia terapêutica eficaz para redução da morbi-mortalidade em pacientes com IM. Entretanto, há evidências de que o restabelecimento da função parassimpática ao coração pode ser igualmente benéfico, uma vez que a diminuição do parassimpático cardíaco é um fator de risco independente de morte súbita. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da inibição da acetilcolinesterase plasmática (AChE), por meio da administração endovenosa do brometo de piridostigmina (PIR), sobre o eletrocardiograma (ECG), hemodinâmica e modulação autonômica após o IM agudo em ratos. Ratos foram anestesiados com uretana e mantidos a uma temperatura de 36-37 °C. Tiveram eletrodos subcutâneos para registro do ECG implantados, e a artéria e veia femoral cateterizadas para medida direta de PA e administração de drogas, respectivamente. Experimentos preliminares foram realizados para determinação de uma dose de PIR que não causasse grande repercussão hemodinâmica. A atividade da acetilcolinesterase plasmática, bem como o tono autonômico cardíaco também foram avaliados em ratos normais. Em outro protocolo, ratos anestesiados, sob registro contínuo do ECG e PA, tiveram o ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda ligado para provocar um extenso IM e, após 10 min, foram tratados com PIR (0,25 mg/kg, i.v) ou salina (solução fisiológica 0,9%), e os registros foram acompanhados por 4 h. Ratos controles tiveram o tórax aberto, mas a artéria coronária foi mantida intacta. Ao final, os ratos tiveram o coração retirado para avaliação da extensão da isquemia miocárdica e para o estudo da expressão de conexina 43. A administração endovenosa de PIR foi efetiva em reduzir a atividade da AChE e provocou uma discreta redução da FC (438±8 para 387±10 bpm), sem alteração da PA. Ratos tratados com PIR tiveram menor tono simpático e maior tono vagal cardíaco que os ratos que receberam salina. O tratamento com PIR diminuiu a incidência de arritmias nos animais com IM e aumentou a porcentagem de ratos que sobreviveram até a 4ª hora após o infarto (72 vs 58% nos não tratados). A PIR também preveniu o aumento do intervalo QTc, observado após o IM em ratos não tratados ($\Delta=-2\pm4$, vs 33±13 ms). A quantidade de conexina 43 foi marcadamente reduzida pelo IM em ratos não tratados (0,7±0,1 vs 2,2±0,4 ua), redução esta que não ocorreu nos ratos com IM tratados com PIR (1,3±0,3 ua). Por fim, foi realizado um ensaio, *in vitro*, em cardiomiócitos da linhagem H9c2 em cultura, e foi observado que a PIR preveniu a degradação da Cx43 induzida por meio isquêmico durante 4 horas. Portanto, a administração aguda de PIR provocou uma bradicardia pouco intensa, sem repercussões hemodinâmicas importantes, aumentou o tono vagal cardíaco, preveniu o prolongamento do intervalo QTc, diminuiu a incidência de arritmias, e preveniu a degradação da Cx43 nos corações dos ratos infartados.

Abstract

Myocardial infarction (MI), a leading cause of death in industrialized societies, is always accompanied by a remarkable change in cardiovascular autonomic modulation, characterized by sympathetic overactivity and decreased vagal tone to the heart. The blockade of the cardiac sympathetic activity has been widely used as an effective therapeutic strategy to reduce morbidity and mortality in patients with MI. However, there is evidence that improvement of parasympathetic function can also be beneficial since reduction of cardiac vagal function is an independent risk factor for sudden death. The aim of this study was to evaluate the influence of inhibition of plasma acetylcholinesterase (AChE), by intravenous administration of pyridostigmine bromide (PYR) on the electrocardiogram (ECG), hemodynamics and cardiovascular autonomic modulation shortly after MI in rats. Rats were anesthetized with urethane and maintained on a heating pad. Subcutaneous electrodes to record the ECG were installed and catheters were inserted into femoral artery and vein for measurement of blood pressure and drug administration, respectively. Preliminary experiments were performed to determine a dose of PYR that would not cause major hemodynamic consequences. Plasma AChE activity, and cardiac autonomic tone were also evaluated in normal rats. Then, anesthetized rats under continuous recording of ECG and BP, had the anterior descending branch of the left coronary artery ligated to elicit extensive MI and, after 10 min, were treated with PYR (0.25 mg/kg, iv) or saline (0.9% NaCl) and monitored for the next 4 h. Control rats had the chest open, but coronary artery was kept intact. At the end, the rats had the heart removed to determine the extension of myocardial ischaemia and connexin 43 expression. Intravenous administration of PYR was effective in reducing AChE activity and caused a mild reduction in HR (438 ± 8 to 387 ± 10 bpm) with no change in BP. Also, rats treated with PYR had lower sympathetic and higher cardiac vagal tone as compared to untreated rats. The treatment with PYR decreased the incidence of arrhythmias after MI and increased the percentage of rats that survived until the 4th hour after infarction (72 vs 58 % in untreated). PYR also prevented the increase in QTc interval observed after MI in untreated rats ($\Delta = -2 \pm 4$ vs 33 ± 13 ms). The amount of connexin 43 was markedly reduced by MI in untreated rats (2.24 ± 0.46 vs 0.72 ± 0.14 au), nevertheless, this reduction was not observed in infarcted rats that received PYR (1.31 ± 0.29 au). Finally, an *in vitro* assay was performed on the line H9c2 cardiomyocytes in culture, and it was observed that PYR prevented the degradation of Cx43 induced by ischemic medium for 4 hours. Therefore, the acute administration of PYR caused mild bradycardia without hemodynamic repercussions, increased vagal tone, prevented the prolongation of the QTc interval, decreased the incidence of arrhythmias and prevented the degradation of Cx43 in infarcted rat hearts.

Lista de Abreviaturas

AChE	Acetilcolinesterase
bpm	Batimentos por minuto
Cx43	Conexina 43
dP/dt	Inclinação máxima do ramo ascendente da curva de pressão do VE
ECG	Eletrocardiograma
FC	Frequência cardíaca
FIMP	Frequência intrínseca de marcapasso
iv	Intravenoso
ip	Intra-peritoneal
IC	Insuficiência cardíaca
IM	Infarto do miocárdio
L-NAME	L-nitro-arginina-metil-éster
NO	Óxido nítrico
PA	Pressão arterial
pH	Potencial hidrogeniônico
PIR	Piridostigmina
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo

Lista de Figuras

Figura 1. Conexina 43 em cardiomiócitos	28
Figura 2. Alterações da FC provocadas pela administração endovenosa de salina ou por diferentes doses de PIR em ratos anestesiados	36
Figura 3. Traçados representativos de eletrocardiogramas de ratos submetidos à oclusão coronariana, mostrando diferentes tipos de arritmias observadas ao longo de 4h após o infarto do miocárdio.....	41
Figura 4. Atividade da acetilcolinesterase plasmática 1 hora após o tratamento com salina ou PIR. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina	49
Figura 5. Fatias do coração de um rato submetido à oclusão do ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda, e perfundido retrogradamente, através da aorta, com o corante Azul de Evans	51
Figura 6. Curvas de sobrevivência nas primeiras 4 horas após o IM em ratos tratados com salina ou PIR. Método estimador de Kaplan-Meier	53
Figura 7. Média \pm EPM das alterações de pressão arterial média (PAM: painel superior) e frequência cardíaca (FC: painel inferior)	55
Figura 8. Média \pm EPM dos deltas do intervalo QTc (painel superior) e PR (painel inferior) nos 2 segmentos de ECG inspecionados no estudo (30 e 240 minutos após IM ou ligadura fictícia da coronária).....	57
Figura 9. Eletrocardiograma de 3 ratos distintos mostrando exemplos de arritmias complexas como (acima), salvas de batimentos ectópicos ventriculares, (meio) bloqueio atrioventricular total e (abaixo) pequeno período de taquicardia ventricular não sustentada encontradas após o infarto do miocárdio.....	58

Figura 10. Expressão da proteína conexina 43 (Cx43), avaliada pelo método de Western blot, nos átrios dos corações de ratos com infarto do miocárdio (IM), tratados, ou não, com piridostigmina (PIR), ou submetidos apenas à ligadura coronariana fictícia (Sham).....	60
Figura 11. Expressão da proteína conexina 43 (Cx43), avaliada pelo método de Western blot, nos ventrículos direitos dos corações de ratos com infarto do miocárdio (IM), tratados, ou não, com piridostigmina (PIR), ou submetidos apenas à ligadura coronariana fictícia (Sham).....	61
Figura 12. Expressão da proteína conexina 43 (Cx43), avaliada pelo método de Western blot, nos ventrículos esquerdos dos corações de ratos com infarto do miocárdio (IM), tratados, ou não, com piridostigmina (PIR), ou submetidos apenas à ligadura coronariana fictícia (Sham).....	62
Figura 13. Expressão da proteína conexina 43 (Cx43), avaliada pelo método de Western blot, em cardiomiócitos da linhagem H9c2 submetidos, ou não à hipóxia na presença ou ausência de PIR.....	63
Figura 14. Fotomicrografias, em microscópio de fluorescência, de cardiomiócitos da linhagem H9c2 em cultura.....	64

Lista de Tabelas

Tabela 1: Valores da frequência cardíaca (FC) uma hora após a administração endovenosa de salina ou piridostigmina (PIR, 0,25 mg/kg). Também, resposta da FC ao propranolol (Tono simpático) e à metil-atropina (Tono vagal).....50

Tabela 2: Valores da PAM e FC antes e 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após o IM, ou cirurgia fictícia, nos 3 grupos estudados54

Índice

Introdução	17
<i>Infarto do Miocárdio</i>	18
<i>Modelo de Infarto Agudo do Miocárdio</i>	18
<i>Infarto do Miocárdio e Disfunção Autonômica</i>	19
<i>Piridostigmina</i>	21
<i>Infarto do Miocárdio e Alterações Eletrocardiográficas</i>	23
<i>Infarto do Miocárdio e Conexina 43</i>	26
<i>Isquemia em Cultura de cardiomiócitos-H9c2</i>	27
Objetivos	31
Métodos	33
<i>Animais</i>	34
<i>Determinação dos efeitos cronotrópicos da administração aguda de piridostigmina</i>	34
<i>Determinação da atividade da acetilcolinesterase plasmática</i>	35
<i>Avaliação do tono autonômico cardíaco</i>	37
<i>Infarto do miocárdio em ratos anestesiados</i>	38
<i>Análise dos Dados</i>	40
<i>Biologia Molecular</i>	42
<i>Anticorpos</i>	42
<i>Processamento das amostras teciduais e Western blot (Conexina 43)</i>	42
<i>Isquemia em cultura celular de cardiomiócitos (H9c2)</i>	43
<i>Processamento de amostras celulares e Western blot (Cx43 em cardiomiócitos isolados)</i>	45
<i>Imunofluorescência</i>	45
<i>Análise Estatística</i>	46

Resultados	47
<i>Perfil hemodinâmico dos ratos anestesiados e atividade da AChE</i>	48
<i>Tono autonômico cardíaco em ratos anestesiados</i>	48
<i>Infarto do miocárdio em ratos anestesiados</i>	48
<i>Taxa de sobrevivência dos animais infartados</i>	52
<i>Respostas hemodinâmicas de ratos infartados</i>	52
<i>Variáveis eletrocardiográficas</i>	56
<i>Quantificação da Conexina 43 no coração de ratos infartados ou não, e tratados ou não com Piridostigmina</i>	59
<i>Quantificação da Conexina 43 em cultura de cardiomiócitos submetidos, ou não, à “isquemia”</i>	59
Discussão	65
<i>Anestesia, tono autonômico cardíaco, e resposta hemodinâmica após administração de Piridostigmina</i>	66
<i>Piridostigmina e Infarto do Miocárdio</i>	68
<i>Piridostigmina e Eletrocardiograma em Ratos com IM</i>	71
<i>Piridostigmina e Conexina 43 em ratos com IM</i>	73
Conclusões e Perspectivas	75
Referências Bibliográficas	78
Manuscrito	92

Introdução

Infarto do Miocárdio

O infarto do miocárdio (IM) é uma das principais causas de morte nas sociedades industrializadas, e, frequentemente, leva ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca (IC). O IM decorre de isquemia, situação na qual a perfusão miocárdica é prejudicada, e o aporte de oxigênio e nutrientes para o coração é perdido. Quando a isquemia é mantida, provoca morte e necrose tecidual (infarto). Em 85% dos casos o IM é devido à formação aguda de trombos em regiões de estenose aterosclerótica das artérias coronárias [Stefan Silbernagl e Florian Lang, 2006].

Além de provocar dor intensa, o infarto agudo do miocárdio acarreta sérias alterações no balanço autonômico cardíaco [Webb e cols 1972], e é uma importante causa de morte súbita, causada, principalmente, por arritmias ventriculares fatais [Nolan e cols 1998, Odemujiwa e cols 1991]. Menos comumente, o IM pode levar à morte por falência cardíaca aguda, com consequente choque circulatório irreversível [Felder e cols 2001].

Apesar dos contínuos esforços no desenvolvimento de tratamentos eficazes para minimizar as consequências do IM, estima-se que 50% dos pacientes morrem, subitamente, nas primeiras horas após o infarto, antes mesmo de receber qualquer atendimento médico [Lowel e cols 1993]. Grande parte destas mortes é causada por arritmias ventriculares, as quais são observadas tanto em humanos [Webb e cols 1972], quanto em modelos experimentais de IM [Optiz e cols 1995].

Modelo de Infarto Agudo do Miocárdio

A ligadura cirúrgica do ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda, em ratos, leva a um grande infarto transmural da parede livre do

ventrículo esquerdo [Pfeffer e cols 1979]. Este modelo tem trazido informações importantes sobre as consequências da necrose miocárdica transmural sobre a função cardíaca e remodelamento do coração [Pfeffer e cols 1979]. Arritmias induzidas por isquemia miocárdica também têm sido estudadas em ratos, tanto *in vitro*, quanto *in vivo* [Curtis e cols 1997, Johnston e cols 1983, Clark e cols 1980, Optiz e cols 1995]. A ligadura cirúrgica do ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda resulta em perda substancial de tecido ventricular, principalmente na parede anterolateral do ventrículo esquerdo (VE). Quando a perda de tecido contrátil não pode ser compensada pelo miocárdio residual, o VE começa a apresentar sinais de insuficiência [Rahimtoola e cols 1972, Kupper e cols 1977]. Três dias após a indução do IM pode ser observado, em ratos, aumento da pressão ventricular diastólica final e menor dP/dt máxima (índice que reflete a contratilidade cardíaca), o que indica um déficit significativo da função cardíaca [Anversa e cols 1985].

Infarto do Miocárdio e Disfunção Autonômica

É bem conhecido que a modulação autonômica cardiovascular sofre grandes alterações após o IM. Hiperatividade simpática [Malliani e cols 1969, Webb e cols 1972] e redução do tono vagal para o coração [Sroka e cols 1997] são sempre observadas logo após o IM. Entretanto, diversos estudos, tanto no nível clínico como experimental, têm mostrado que essas alterações autonômicas podem até mesmo preceder os eventos isquêmicos que levam ao IM [Sroka e cols 1997, Kochiadakis e cols 2000, Willem e cols 2001].

Embora o aumento do tono simpático cardíaco possa ser benéfico nos estágios iniciais do IM, por aumentar a força de contração do miocárdio

remanescente, uma simpato-excitação prolongada é, por uma série de fatores, extremamente deletéria ao sistema cardiovascular. O aumento da frequência cardíaca (FC), cuja maior implicação é o aumento do consumo de oxigênio pelo miocárdio, deprime as reservas de substratos energéticos, dificulta a perfusão subendocárdica, e aumenta a incidência de arritmias ventriculares pela diminuição do limiar de excitabilidade dos cardiomiócitos [Zucker e cols 1995, Frenneaux 2004]. A hiperatividade simpática está fortemente relacionada à ocorrência de arritmias ventriculares graves e com o alto índice de morte súbita causada pelo IM [Cohn e cols 1984, Ferguson e cols 1990, Kaye e cols 1995].

Por outro lado, a diminuição da atividade parassimpática para o coração no IM, avaliada em estudos da variabilidade de FC, está igualmente associada a arritmias e morte súbita [Hartikainen e cols 1996]. Desta forma, podemos supor que a atividade parassimpática, por meio da ação colinérgica no coração, possa exercer um papel importante na sobrevivência dos pacientes nos estágios iniciais do IM. Tal fato já foi demonstrado em estudos clínicos e experimentais na fase inicial da insuficiência cardíaca decorrente do IM, como descrito a seguir:

Li e cols [2004] observaram que a estimulação elétrica do nervo vago durante 6 semanas após o IM aumentou a sobrevivência de ratos ao prevenir o remodelamento cardíaco e a disfunção do VE. A mesma abordagem, realizada em cães com IM, atenuou a progressão da IC e melhorou o controle autonômico, observado pelo aumento da variabilidade da FC, aumento da sensibilidade do barorreflexo, e redução da concentração plasmática de noradrenalina [Zhang e cols 2009]. Em 32 pacientes com IC, a estimulação elétrica do nervo vago realizada durante 6 meses, foi associada à melhora da

classificação funcional da IC (segundo a *New York Heart Association*), além de melhora da qualidade de vida e da fração de ejeção do VE [Schwartz e cols 2008].

Teoricamente, substâncias que aumentam a disponibilidade da acetilcolina na fenda sináptica podem ter efeitos semelhantes aos obtidos com a estimulação do nervo vago. Agentes anticolinesterásicos impedem a hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase, prolongando a disponibilidade desse neurotransmissor na fenda sináptica [Taylor 2001]. Estes agentes têm sido utilizados, experimentalmente, com o objetivo de aumentar o controle parassimpático sobre o coração [Desai e cols 2011]. O anticolinesterásico donepezila melhorou a função cardíaca em ratos com IC [Okazaki e cols 2010]. Entretanto, no sistema nervoso central pode provocar efeitos indesejáveis como tontura, náusea e insônia [Mimica e cols 2009, Sato e Nakatsuka 2013].

Piridostigmina

O brometo de piridostigmina (PIR) é um composto amônio quaternário capaz de se ligar reversivelmente à enzima acetilcolinesterase, inibindo sua ação [Taylor e cols 2001]. Uma vez que a hidrólise da acetilcolina é impedida, o aumento resultante da concentração desta na fenda sináptica confere à PIR uma potencial ação vagomimética [Taylor e cols 2001]. A PIR é comumente usada no tratamento de pacientes com miastenia grave [Breyer-Pfaff e cols 1985], e também foi utilizada como método profilático contra compostos organofosforados, especialmente durante a Guerra do Golfo Pérsico [Sapolsky 1998]. Brevemente, os compostos organofosforados são inibidores irreversíveis da acetilcolinesterase plasmática, e provocam intoxicação colinérgica que

resulta, frequentemente, em morte [Bird e cols 2003, Chen 2005]. Assim, passou-se a utilizar, profilaticamente, inibidores reversíveis da acetilcolinesterase, como a piridostigmina, com o objetivo de bloquear, farmacologicamente, por meio de inibição competitiva, a ligação destes agentes à acetilcolinesterase, e conseqüentemente, minimizar os efeitos provocados por esta intoxicação [Layish e cols 2005].

Entretanto, além das condições descritas anteriormente, a PIR também foi utilizada em estudos clínicos com o intuito de aumentar a modulação colinérgica em condições patológicas onde o controle parassimpático cardíaco está reduzido, como por exemplo, no IM e na IC [Castro e cols 2002, Behnling e cols 2003]. Quando administrada a indivíduos saudáveis durante um ou dois dias, a PIR induziu bradicardia [Nóbrega e cols 1996, Dewland e cols 2007]. Além disto, pacientes com IC submetidos ao tratamento com PIR também apresentaram bradicardia e diminuição da incidência de arritmias [Behnling e cols 2003]. Isto sugere que a PIR pode alterar o balanço simpato-vagal cardíaco, reduzindo a atividade simpática e aumentando a atividade vagal, não só em condições fisiológicas, como também numa condição patológica.

Estudos recentes realizados em nosso laboratório mostraram que, ao ser administrada cronicamente, na água de beber, a PIR provocou efeitos benéficos tanto na fase inicial (10 dias) quanto tardia (4 semanas) da IC induzida por IM em ratos. O tratamento com PIR aumentou o tônus vagal cardíaco [Dias e cols 2012, Lataro e cols 2013], e diminuiu o tono simpático, além de reduzir a fibrose miocárdica, diminuir a hipertrofia cardíaca, e melhorar a função cardíaca, a qual foi observada pelo aumento da fração de ejeção e da dP/dt máxima do VE [Lataro e cols 2013].

Infarto do Miocárdio e Alterações Eletrocardiográficas

Uma das principais alterações eletrocardiográficas observadas após o IM é o desnivelamento do segmento ST. O prognóstico do paciente com IM é tanto pior quanto maior for a magnitude deste desnivelamento [Nielsen e cols 1973]. Outra anormalidade eletrocardiográfica comumente encontrada após o IM é o prolongamento do intervalo QT e/ou intervalo QT corrigido pela FC (QTc) [Doroghazi e Childers 1978, Haynes e cols 1978, Schwartz e Wolf 1978, Ahnve e cols 1980]. O intervalo QT do ECG representa o tempo entre a despolarização e repolarização ventricular, assim, seu prolongamento ocorre quando há um atraso da repolarização do miocárdio ventricular. Este prolongamento pode ser provocado por diferentes fatores como hipotermia local [Emslie-Smith e cols 1959], depleção de catecolaminas na zona isquêmica, tamanho da área comprometida pelo infarto e hipocalcemia local [Doroghazi e Childers 1978].

Registros eletrocardiográficos em ratos, realizados por meio de eletrodos convencionais ou sondas de telemetria, evidenciaram dois períodos arritmogênicos distintos após o IM: um mais precoce, durante a primeira meia hora após o infarto, e um mais tardio, entre 2 e 9 horas após o IM [Curtis e cols 1987, Optiz e cols 1995]. Cada um destes períodos foi seguido por um período quiescente de baixa atividade arritmica. Uma taxa de mortalidade de 65% foi encontrada dentro dos dois períodos arrítmicos, com a maioria das mortes ocorrendo no segundo. Além disso, ratos com os maiores infartos apresentaram maior frequência e duração dos episódios de arritmias [Optiz e cols 1995].

Esses dois períodos distintos de arritmias observados no rato com IM são semelhantes ao curso temporal bifásico das arritmias observadas tanto em

cães quanto em seres humanos após o infarto [Bigger e cols 1977, Campbell e cols 1981, Pantridge e cols 1981, Zehender e cols 1991, Heidbüchel e cols 1994, Harris 1950, Kaplinsky e cols 1979, Wit e Janse 1993a]. Entretanto, os possíveis mecanismos envolvidos na gênese destas arritmias são pouco conhecidos e podem ser diferentes para cada um desses períodos [Opitz e cols 1995]. No primeiro, onde a necrose miocárdica ainda não se completou, muito provavelmente o aumento de potássio extracelular 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 [Wit e Janse 1993a, Kaplinsky e cols 1979]. Já o segundo período, que corresponde ao desenvolvimento máximo da necrose miocárdica, provavelmente está associado à presença de cardiomiócitos com automatismo anormal localizados na zona de transição entre o miocárdio necrótico e o miocárdio isquêmico ainda viável [Wit e Janse 1993b]. Muitas alterações do ritmo cardíaco estão associadas às alterações funcionais no acoplamento elétrico entre os cardiomiócitos (Peters e cols 1993, Lerner e cols 2000). Alterações nas conexinas, que são proteínas formadoras das junções comunicantes, ou *gap junctions*, no músculo cardíaco, já foram demonstradas em doenças do coração com alto índice de arritmias, como o IM [Peters e cols 1993] e a IC [Poelzing e Rosenbaum 2004]. A redução da conexina 43, principal proteína das junções comunicantes, aumenta a incidência de taquiarritmias ventriculares [Lerner e cols 2000] e diminui a velocidade de condução do potencial de ação durante a isquemia miocárdica [Gutstein e cols 2001].

Outro mecanismo potencialmente arritmogênico que deve ser levado em consideração é a alteração do balanço autonômico que acompanha o processo

da isquemia miocárdica [Zipes 1990, Opitz e cols 1995]. O aumento da FC, comumente observado após o infarto da parede anterior do VE, tem sido atribuído ao aumento da atividade simpática que ocorre no IM. Como já descrito anteriormente, esta hiperatividade simpática cardíaca, reconhecidamente, desempenha um importante papel na arritmogênese e, conseqüentemente, na mortalidade após o IM [Schwartz e cols 1992]. Por outro lado, apesar da redução do tono parassimpático cardíaco já ter sido identificada como um fator independente de risco em pacientes com IM [Kleiger e cols 1987, La Rovere e cols 1998], poucos são os estudos que têm avaliado o papel da atividade parassimpática durante a fase precoce do infarto e a possível correlação do seu comprometimento com os períodos arritmogênicos acima descritos [Zipes 1990, Schwartz e cols 1992, Bolli e cols 1986]. Dentre os vários estudos, clínicos e experimentais, que tentam identificar um agente antiarrítmico que promova maior eficácia e menor risco de morte aos pacientes acometidos pelo IM, encontram-se a lidocaína (bloqueador de canais de sódio) [Canyon e Dobson, 2004], o propranolol (bloqueador de receptores adrenérgicos no coração) [Heidenrich e cols 1997, Zhang e cols 2010] e a amiodarona (agente antiarrítmico com mecanismos de ação diversos) [Deedwania e cols 1998].

A justificativa do presente estudo se baseia no fato de que embora seja reconhecida a importância clínica do tratamento da hiperatividade simpática no IM [Schwartz e cols 1992, Bolli e cols 1986, Corr e Gillis 1978], poucos são os estudos que procuraram alternativas terapêuticas para aumentar a reduzida atividade vagal cardíaca nesta condição. Tais estudos, os quais utilizaram essencialmente antagonistas de receptores colinérgicos, como a pirenzepina

[Pedretti e cols 1995] ou baixas doses de escopolamina [Casadei e cols 1993, Pedretti e cols 1993, Vybiral e cols 1993], revelaram resultados conflitantes. Assim, é evidente a necessidade de estudos adicionais para que se compreenda o papel da atividade parassimpática em alterações cardíacas decorrentes do IM.

Infarto do Miocárdio e Conexina 43

O batimento cardíaco normal é resultado das contrações individuais dos cardiomiócitos, sincronizadas através do sinal elétrico gerado dentro do nó sinoatrial e que rapidamente se propaga através do sistema de condução especializado para os ventrículos. A partir daí, a corrente de despolarização move-se através dos cardiomiócitos, os quais são caracterizados pelo elevado grau de acoplamento célula-a-célula, por meio de junções comunicantes ou discos intercalares, também conhecidas como *gap junctions*, que permite uma rápida propagação do sinal elétrico por entre as células [Vuyst e cols 2011, Guyton e Hall, 2002].

As proteínas denominadas conexinas são os principais componentes dos discos intercalares, e são de fundamental importância para manter a estabilidade elétrica da membrana celular cardíaca. A conexina 43 (Cx43) é a proteína mais abundante nas junções comunicantes dos ventrículos cardíacos, e sua função é regulada pela sua quantidade e também por seus níveis de fosforilação. A fosforilação da Cx43 pode modular as propriedades e a dinâmica dos canais por elas constituídos. Ela é sintetizada no interior da célula e, uma vez transportada para a membrana plasmática, passa a exercer sua função de acoplamento célula-a-célula [Musil e cols 1991, Lampe e cols 2000].

A figura 1 ilustra a formação de uma *gap junction*. Evidências sugerem que a Cx43 está envolvida na modificação das condições arritmogênicas [Moon e cols 2000, Jain e cols 2003] uma vez que camundongos knockouts para a Cx43 apresentam 95% de chance de apresentarem arritmias letais, tais quais taquicardia e fibrilação ventricular [Van Rijen e cols 2004]. Além disto, estudos experimentais mostraram que a quantidade total de Cx43 está diminuída na isquemia [Ando e cols 2005], no IM [Peters e cols 1993], e na IC [Poelzing e Rosenbaum 2004]. Foi observado ainda que a estimulação colinérgica cardíaca, tanto *in vitro* [Zhang e cols 2006] quanto *in vivo* [Ando e cols 2005] previniu a degradação, e também a desfosforilação da Cx43. Tais achados da literatura contribuíram para a elaboração de uma nova pergunta acerca do possível efeito benéfico produzido pela PIR na fase inicial do IM. Poderia a piridostigmina, por aumentar a concentração endógena da acetilcolina, exercer alguma modulação sobre o metabolismo da Cx43?

Isquemia em Cultura de cardiomiócitos-H9c2

Para melhor se compreender o funcionamento da Cx43 na fibra muscular cardíaca, alguns trabalhos têm sido realizados em diferentes linhagens celulares de cardiomiócitos (*in vitro*), como por exemplo, as linhagens HL1 de camundongos [Fidler e cols 2009] e H9c2 de cardiomiócitos de ratos (Zhang e cols 2006, Rocha-Resende e cols 2012).

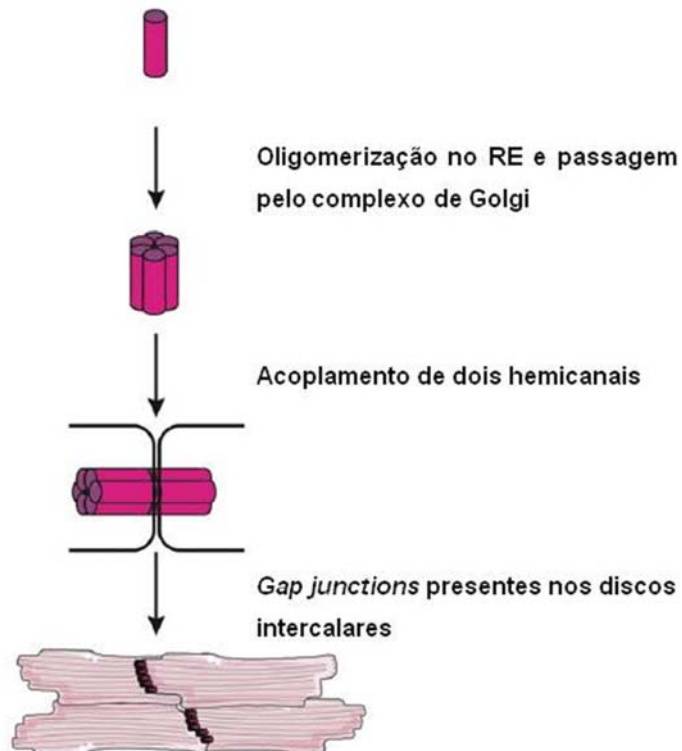


Figura 1. Conexina 43 em cardiomiócitos. Cx43 é uma proteína transmembrana com quatro regiões transmembranares. Após oligomerização no retículo endoplasmático (RE) e organização no complexo de Golgi, hemicanais ou conexons são formados. O acoplamento de dois hemicanais resulta na formação de uma *Gap junction*. Cardiomiócitos estão fortemente conectados via gap junctions localizadas nas extremidades distais chamadas discos intercalares. (Modificada de Vuyst e cols 2011).

A linhagem celular H9c2 foi derivada de cardiomiócitos do coração de embrião de ratos e foi primeiramente descrita por Kimes e Brandt [1976]. Mais tarde foi demonstrado que apesar das células H9c2 exibirem características morfológicas similares às de cardiomiócitos embrionários imaturos, elas também preservam diversos elementos da via de sinalização elétrica e hormonal encontradas em cardiomiócitos adultos [Hescheler e cols 1991]. Assim, as células H9c2 são consideradas uma importante ferramenta para o estudo funcional de cardiomiócitos, no aspecto de sua maquinaria intracelular e transdução de sinais transmembrana [Hescheler e cols 1991, Zhang e cols 2006].

Já foi demonstrado, em cultura primária de cardiomiócitos de ratos, que 30 minutos de hipóxia induz uma diminuição da quantidade total de Cx43, bem como da sua forma fosforilada nessas células. E ainda que, o pré-tratamento com acetilcolina previniu a degradação e desfosforilação da Cx43 em cardiomiócitos, efeito este inibido na presença de atropina, um bloqueador de receptores colinérgicos muscarínicos [Ando e cols 2005]. O mesmo resultado foi observado por Zhang e cols [2006], ao induzirem hipóxia durante 1 hora em células H9c2 previamente tratadas com acetilcolina. Acredita-se que este papel protetor da acetilcolina sobre a degradação da Cx43 seja mediado principalmente pelo óxido nítrico (NO), uma vez que na presença de L-NAME (L-nitro-arginina-metil-éster, inibidor da síntese de NO) a acetilcolina não previniu a degradação da Cx43 induzida pela hipóxia [Zhang e cols 2006].

Como já descrito anteriormente, existem evidências de que a arritmogênese, observada tanto na fase inicial, quanto na fase tardia da isquemia cardíaca, está relacionada, dentre outros fatores, à degradação da

proteína Cx43 nas junções comunicantes dos cardiomiócitos [Poelzing e Rosenbaum 2004, Ando e cols 2005]. Deste modo, baseado na premissa de que a acetilcolina é capaz de prevenir a degradação da Cx43, o estudo, *in vitro*, do efeito da piridostigmina sobre as conexinas da linhagem celular H9c2 pode ser complementar ao estudo *in vivo* da administração desse fármaco no infarto do miocárdio.

Assim, a hipótese deste estudo foi a de que o tratamento precoce com uma única administração de PIR poderia minimizar as alterações hemodinâmicas e eletrocardiográficas decorrentes do IM, bem como diminuir a incidência de arritmias. Igualmente, que o tratamento precoce com esta substância poderia contribuir com a diminuição da mortalidade em ratos anestesiados submetidos ao IM. Por fim, por não haver, até o presente momento, relato na literatura acerca do efeito da PIR na fase inicial do IM, propusemo-nos a investigar, também, possíveis mecanismos moleculares envolvidos com a ação da PIR sobre os cardiomiócitos submetidos à isquemia (*in vitro*) ou IM (*in vivo*).

Objetivos

Avaliar, em um modelo de IM experimental em ratos, o efeito da inibição da acetilcolinesterase por meio da administração endovenosa de brometo de piridostigmina, sobre variáveis cardiocirculatórias como: pressão arterial (PA), FC, ECG e arritmias cardíacas, bem como na proteína de *gap junction* cardíaca, conexina 43, dos cardiomiócitos submetidos ao infarto do miocárdio.

Especificamente: Avaliou-se, em ratos anestesiados, antes e durante as primeiras 4 horas após IM (ou infarto fictício), as seguintes variáveis:

1. Parâmetros cardiocirculatórios: PA e FC;
2. Alterações eletrocardiográficas: Intervalo QT corrigido pela FC (QTc) e intervalo PR;
3. Incidência de arritmias após o IM;
4. Quantificação da proteína conexina 43 (Cx43)
5. Taxa de sobrevivência dos animais submetidos ao IM.

Métodos

Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CETEA-FMRP: Protocolo número 177/2011).

Animais:

Foram utilizados ratos adultos jovens, da linhagem Wistar, com peso entre 280 e 300 g, provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia, acondicionados em uma sala com temperatura entre 23 e 25 °C, umidade entre 40 e 70%, e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração.

Determinação dos efeitos cronotrópicos da administração aguda de piridostigmina:

Tendo em vista a escassez de estudos onde piridostigmina (PIR) tenha sido administrada agudamente, por via endovenosa, foi necessária a realização de experimentos preliminares, a fim de definir uma dose dessa droga que fosse bem tolerada e não provocasse alterações cronotrópicas importantes, o que comprometeria o desempenho cardiocirculatório dos animais durante a realização dos experimentos.

Então, ratos foram anestesiados com uretana (etilcarbamato, 1 g/kg, ip, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), e colocados sobre uma placa aquecida (Insight Equipamentos para Ensino e Pesquisa, Ribeirão Preto, SP) a fim de manter a temperatura corporal entre 36 e 37 °C. Eletrodos para o registro do ECG foram posicionados no tecido subcutâneo das patas dianteiras e traseiras

dos animais, e um cateter de polietileno (Intramedic, Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) foi inserido na veia femoral para a administração de PIR (Valeant Pharmaceuticals, Campinas, SP, Brasil). Os eletrodos foram então conectados a um amplificador diferencial (CL-615422-1, Gould Instruments Systems, Inc., OH, USA) acoplado a um sistema computadorizado de registro (PowerLab, ADInstruments) e, após o registro basal do ECG (derivação II de Einthoven), os ratos receberam PIR nas doses de 0,125 mg/kg (N=6), 0,25 mg/kg (N=6) ou 0,5 mg/kg (N=6). Um grupo de ratos recebeu apenas salina (NaCl 0,9%, N=6) e o registro eletrocardiográfico continuou por 1h.

A figura 2 ilustra o efeito das diferentes doses de PIR sobre a FC dos ratos. A dose de 0,25 mg/kg foi escolhida para realização do estudo por ter induzido redução da FC na ordem de apenas 10 a 12%.

Determinação da atividade da acetilcolinesterase plasmática:

Dois grupos de ratos foram anestesiados com uretana na dose descrita anteriormente, e implantados com cateteres de polietileno na artéria e veia femoral para coleta de sangue arterial e administração de salina ou PIR, respectivamente. Uma hora após a administração de salina (0,3 mL, iv, N=4) ou PIR (0,25 mg/kg, iv, N=4), uma amostra de 0,3 mL de sangue arterial foi retirada dos ratos, e colocada num tubo para centrifugação contendo 30 µL de EDTA (0,1 M, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As amostras foram centrifugadas durante 20 minutos a 3.500 rpm a 4 °C e, em seguida, o plasma foi coletado e o ensaio enzimático foi realizado por meio da adaptação do método colorimétrico de Ellman e colaboradores [1961].

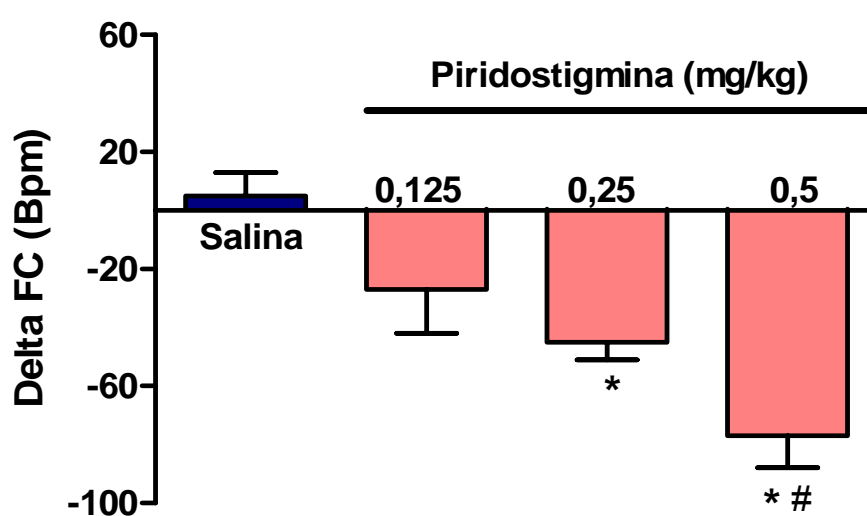


Figura 2. Alterações da FC (Média ± EPM) provocadas pela administração endovenosa de solução salina isotônica ou por diferentes doses de piridostigmina (PIR) em ratos anestesiados. * $p < 0,05$ comparado ao grupo que recebeu apenas salina. # $p < 0,05$ comparado ao grupo tratado com a dose de 0,25 mg/kg de PIR.

Brevemente: amostras de plasma (10 µL) foram incubadas em placas com 5,5'-dithio-bis (0,01 M, 2-nitrobenzoic acid, DTNB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e excesso de substrato (Acetilthiocolina, 0,075 M, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em 0,2 mM de tampão fosfato, pH 8,0, na presença do inibidor seletivo da butirilcolinesterase (IsoOMPA, 10⁻³ M, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A síntese da reação foi avaliada, a 30 °C, em leitor de microplacas (BioTek FL600, BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT, USA) com 412 nm, durante 45 minutos, com intervalos de 3 minutos. A velocidade da reação para cada amostra foi determinada em duplicata e expressa em unidades arbitrárias por minuto.

Avaliação do tono autonômico cardíaco

Ratos foram anestesiados com uretana, posicionados sobre uma placa aquecida, e instrumentados com eletrodos para ECG e cateter na veia femoral conforme descrito anteriormente. Além do cateter venoso, esses ratos também receberam um cateter de polietileno na artéria femoral para permitir o registro direto da PA.

Os eletrodos foram conectados ao equipamento de registro de ECG, conforme descrito anteriormente, enquanto o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (MLT0380/D, ADInstruments, Sydney, Australia), de modo a permitir o registro simultâneo (500 Hz) da PA e do ECG em um microcomputador equipado com uma interface analógico-digital (DI-720 Dataq System, Akron OH, EUA). Após 20 minutos de registro basal, os animais receberam injeção intravenosa de salina (NaCl 0,9%, 0,3 mL, N=16) ou PIR (0,25 mg/kg, N=18). Uma hora após a administração de salina ou PIR, os ratos

foram tratados com os bloqueadores de receptores autonômicos cardíacos metil-atropina (1 mg/kg, iv) seguido, após 15 minutos, de propranolol (2 mg/kg, iv). Metade dos ratos de cada grupo (salina ou PIR) recebeu os bloqueadores autonômicos na ordem inversa, ou seja, propranolol seguido da metil-atropina.

As alterações da FC provocadas pela metil-atropina foram consideradas como tono vagal cardíaco, enquanto aquelas provocadas pelo propranolol foram consideradas como tono simpático cardíaco. A FC observada na presença de ambos os bloqueadores autonômicos, isto é, sem a influência do sistema nervoso autônomo, foi considerada frequência intrínseca de marcapasso (FIMP).

Infarto do miocárdio em ratos anestesiados

Para o estudo dos efeitos da PIR em ratos com IM, estes foram anestesiados, colocados sobre placa aquecida e instrumentados conforme descrito anteriormente. Sob registro contínuo da PA e ECG, os ratos receberam uma cânula oro-traqueal, conectada a um sistema de monitorização contínua da concentração de CO₂ no ar expirado (Micro Capstar End-tidal CO₂ analyser, CWE, USA), a fim de fornecer, indiretamente, informações sobre o metabolismo do animal anestesiado. Os ratos foram colocados em ventilação artificial (Harvard Apparatus Rodent Respirator: Model 680, Holliston, MA, USA) e tiveram o tórax aberto para realização da ligadura coronariana, conforme descrito por Johns e Olson [1954]. De forma sucinta: O coração foi exposto através de uma incisão feita no terceiro espaço intercostal esquerdo, e o ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda foi identificado e ligado com um fio de poliéster 4-0. Em seguida, pressão negativa foi aplicada ao espaço

pleural para drenagem do pneumotórax e o tórax foi rapidamente fechado por sutura. Ratos controles foram submetidos à cirurgia para IM fictício, ou seja, passaram por procedimentos semelhantes aos descritos acima, com exceção da ligadura da artéria coronária. Após o IM, a PA, ECG e concentração de CO₂ no ar expirado continuaram monitorizados por 4 horas.

Ao final do experimento os ratos tiveram o coração cuidadosamente retirado e retrogradamente perfundido (pela aorta), utilizando uma bomba peristáltica (Bomba dosadora peristáltica 626 Milan-Equipamentos Científicos Ltda, Indústria Brasileira), com 30 a 40 mL de azul de Evans 0,5 %, e colocado por 12 a 18 h em uma solução de formol (10 %, pH 7,4) para fixação. No dia seguinte, o coração foi cortado em 6 fatias com 2 mm de espessura cada, e em seguida foram coletadas imagens de cada fatia (Scanner HP DeskJet 2050), juntamente com uma régua para calibração. A quantificação da região infartada foi feita nas imagens coletadas utilizando o programa computacional de uso livre *Image J* (disponível na rede mundial de computadores no sítio da U.S. National Institute of Health: <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>). Apenas ratos que apresentaram isquemia com extensão superior a 35% da circunferência do ventrículo esquerdo foram utilizados no presente estudo.

Parte dos animais submetidos ao mesmo protocolo experimental teve os corações retirados, lavados em tampão fosfato, PBS (*phosphate-buffered saline*), e congelados a -20° C. Os ventrículos direito e esquerdo, bem como os átrios foram separados e armazenados a -80 °C para a quantificação da proteína Cx43 nesses tecidos.

Ao final de todos os protocolos experimentais os animais foram mortos por sobredose de anestésico (tribromoetanol, iv).

Análise dos Dados:

Os arquivos com os registros de PA e ECG foram processados por um programa computacional específico (LabChart 7.3.1, ADInstruments, Sydney, Australia). A pressão arterial média (PAM) foi calculada a partir do registro da PA pulsátil, enquanto a FC foi derivada dos intervalos RR dos ECG. As análises foram feitas em segmentos estáveis do registro contendo entre 2 e 3 mil ciclos cardíacos, extraídos do período basal (antes do IM), bem como a cada hora após o infarto. Para a análise dos intervalos QT e PR do ECG, foi utilizado um módulo específico do programa LabChart. Este módulo calcula a média do ECG a cada 25 batimentos, alinhados pelo pico de voltagem das ondas R. Então, um algoritmo matemático, especialmente desenvolvido para essa finalidade, identifica o início e o final de cada uma das ondas do ECG e calcula, automaticamente, os intervalos e segmentos eletrocardiográficos. Uma interface gráfica permite que o usuário corrija, manualmente, qualquer erro na detecção automática das ondas. O intervalo QTc, ou seja, o intervalo QT corrigido pela FC, foi calculado automaticamente pelo módulo de ECG do LabChart, o qual utilizou a fórmula de Bazett para realizar tal correção (QT/\sqrt{RR}).

Também, segmentos do ECG com exatamente 2 mil batimentos foram selecionados durante o período basal (antes do IM), bem como a cada hora após o infarto, para inspeção visual cuidadosa do ritmo cardíaco. A presença de distúrbios do ritmo cardíaco (figura 3) foi identificada e o número de batimentos ventriculares prematuros (BVP) foi quantificado em cada um destes segmentos inspecionados.

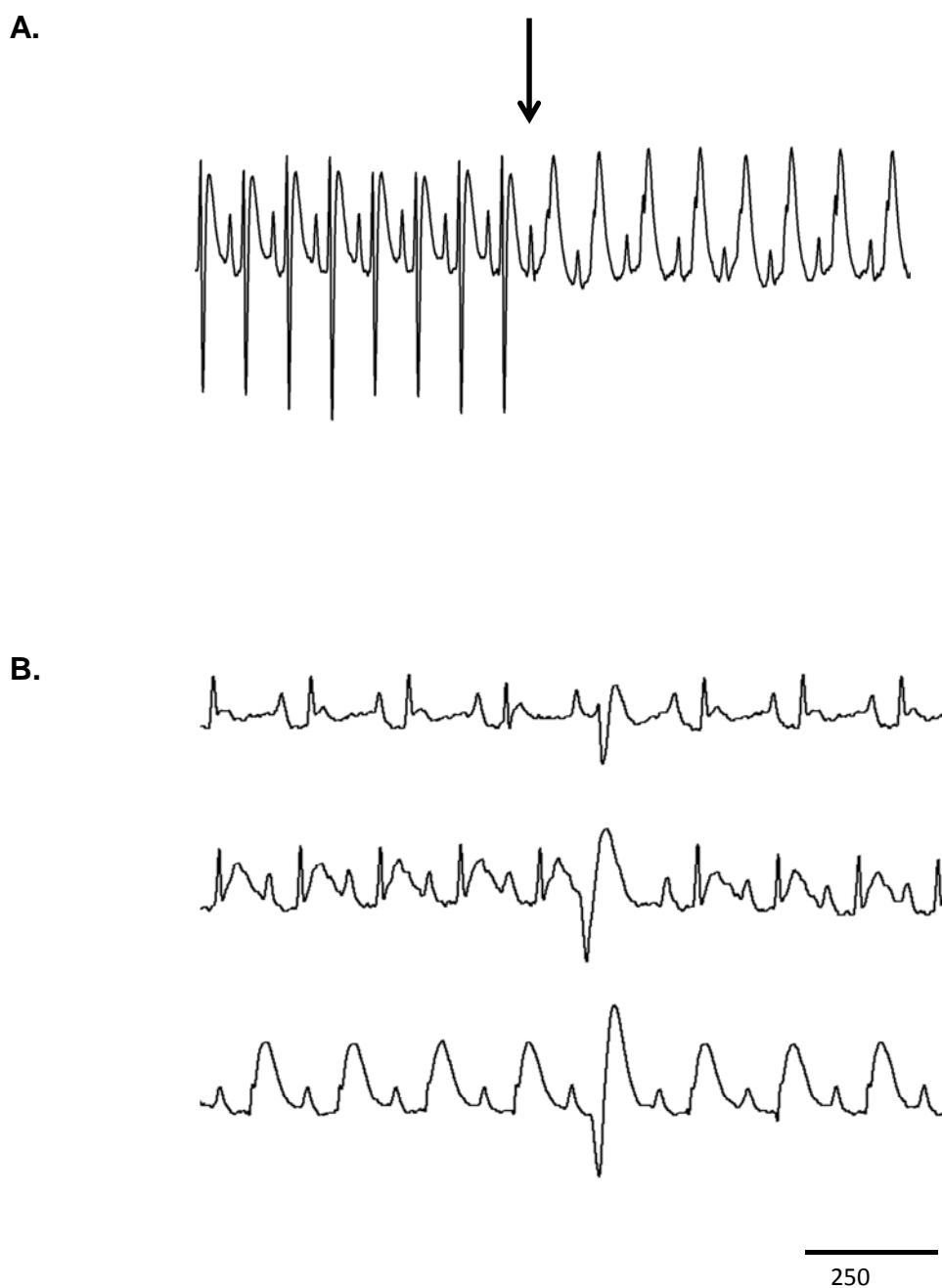


Figura 3. A. Traçado representativo da alteração eletrocardiográfica (corrente de lesão: supradesnivelamento do segmento ST) causada no momento do infarto do miocárdio em um rato anestesiado. Seta indica o momento após ligadura coronariana. B. Eletrocardiograma de 3 ratos distintos, mostrando exemplos de batimentos ventriculares prematuros isolados, após o infarto do miocárdio.

Biologia Molecular

Anticorpos

Para a realização da técnica de *Western blot* nos corações submetidos à ligadura coronariana foram utilizados os seguintes anticorpos:

- anticorpo policlonal feito em cabra contra conexina 43 (Cx43, diluição 1:5000, Sicgen, Portugal);
- anticorpo monoclonal feito em camundongo contra tubulina (diluição 1:10.000, Sigma-Aldrich);
- anticorpo policlonal feito em cabra contra *Glyceraldeyde 3-phosphate dehydrogenase*-GAPDH (diluição 1:5000, Sicgen, Portugal);
- anticorpo secundário ligado à peroxidase (*Horseradish peroxidase*) anti-cabra feito em camundongo, e anti-camundongo feito em cabra (diluição: 1:10.000, Bio-Rad, Hercules, Califórnia, USA).

Processamento das amostras teciduais e Western blot (Conexina 43):

Para a extração de proteínas das diferentes partes do coração - átrio, ventrículo direito e esquerdo - pequena amostra destes tecidos foi separada. Adicionou-se ao tubo de microcentrifugação o tampão de extração (100uL/100µg) com o coquetel de inibidores de proteases (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA), e em seguida o tecido cardíaco foi homogeneizado (Potter Elvehjem). O homogenato foi centrifugado a 3.200 rpm, por 5 minutos a 4 °C, e depois de coletar o sobrenadante, o mesmo foi centrifugado a 13.200 rpm, por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, e parte da amostra foi utilizada para a realização da quantificação da proteína pelo método BCA (Pierce - Thermo

Scientific, Waltham, MA, USA). A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm. Para os ensaios de *Western blot* as amostras foram desnaturadas com tampão de *Laemmli* e aquecidas a 95 °C por 5 min. As proteínas (50 µg proteína/poço) foram separadas por eletroforese (120 volts/ 1h e 15 min), em gel com 10 % de poliacrilamida e transferidas (100 volts/ 1h e 15 min) para membranas de nitrocelulose (Nitrocellulose membranes, 0,45 µm, Cat.# 162.0115, Bio-Rad Laboratory, Germany). A eficiência da transferência foi verificada pela coloração das membranas com o corante *Ponceau*. Em seguida, as membranas foram lavadas em tampão TBS-T (*Tris buffered saline with tween 20*; 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,2 %, pH 7,6), bloqueadas com 5 % de leite por 30 minutos, e incubadas em anticorpo primário anti-Cx43 por 12 horas (*overnight*) a 4 °C. No dia seguinte, após lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por 2 horas em anticorpo secundário à temperatura ambiente. Por último, as proteínas foram detectadas por quimioluminescência utilizando-se o *kit* ECL (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia).

As imagens das bandas foram capturadas utilizando-se câmera e aparelho Versadoc Imaging system 4000 MP (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, USA) e posteriormente analisadas pelo software *Image J* (disponível na rede mundial de computadores no sítio da U.S. National Institute of Health: <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>). O GAPDH foi utilizado como controle endógeno da reação.

Isquemia em cultura celular de cardiomiócitos (H9c2)

Além das quantificações da Cx43 nos corações dos ratos controles ou infartados, tratados ou não com piridostigmina, também realizamos o estudo, *in*

vitro, para avaliar o efeito do tratamento com PIR sobre a degradação da Cx43 em cardiomiócitos submetidos, ou não, a um meio, com baixa concentração de oxigênio e nutrientes, o que mimetiza condições teciduais isquêmicas. Para tanto, foi utilizada a linhagem celular de cardiomiócitos H9c2.

A linhagem celular H9c2 foi originalmente derivada do tecido embrionário do coração de ratos, e foram obtidos a partir da Coleção Europeia de Culturas de Células (Reino Unido). As células foram cultivadas em placas de cultura (Orange Scientific, Tissue culture plate, Cat.# 4430400) em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10 % de soro bovino fetal inativado pelo calor (FBS), antibióticos (100 U/ mL de penicilina, 100 ug/ mL de estreptomicina) e glutamax (1x). Todos os meios de cultura celular, glutamax e antibióticos foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, Califórnia, EUA). As células foram mantidas a 37 °C numa câmara úmida com 5% de CO₂.

Para simular uma condição de isquemia na cultura celular, utilizou-se um meio específico (118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 20 mM de HEPES pH 6.6, 1,2 mM CaCl₂, 20mM deoxiglicose e 5 mM de Lactato de Ca⁺²). Além disso, a placa contendo as células foi incubada na câmara dentro de um sistema específico para induzir hipóxia (BD GasPak TM EZ Anaerobic Pouch System, BD Cat # 260683, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA), e a mesma permaneceu nesta condição por um período de 4 horas.

As células foram submetidas a três condições experimentais distintas: Controle (normóxia), “isquemia” durante 4 horas sem tratamento, e “isquemia” durante 4 horas na presença de piridostigmina (1 mM/L). O experimento foi repetido 3 vezes.

Processamento de amostras celulares e Western blot (Cx43 em cardiomiócitos isolados):

Após retiradas da câmara de armazenamento, as placas contendo as células foram lavadas em PBS e, para os ensaios de *Western blot* as amostras foram desnaturadas com tampão de *Laemmli* e aquecidas a 95° C por 5 minutos. Os processos de eletroforese, transferência de proteínas, bloqueio e incubação das membranas com anticorpos foram realizadas de igual forma à descrita para o tecido cardíaco.

Imunofluorescência:

As células H9c2 foram fixadas durante 10 minutos em formaldeído 4 % preparado em PBS, e, subsequentemente foram lavadas em PBS, bloqueadas e permeabilizadas (1% BSA, *Bovine Serum Albumins*, e 0,01% Triton X-100). As células foram então incubadas com o anticorpo monoclonal contra a Cx43 durante 1 hora à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas 3 vezes com PBS antes da incubação com o anticorpo secundário, por 1 hora à temperatura ambiente. As células foram lavadas em PBS e montadas em lamínulas de vidro (10 mm, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) com o reagente MOWIOL 4-88 (Calbiochem). Todas as soluções foram preparadas em 0,2% w/v BSA (Sigma-Aldrich) contendo 0,02% de azida de sódio (Sigma-Aldrich) em PBS. O 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) foi preparado (diluição 1:5000) juntamente à solução do anticorpo secundário afim de marcar o DNA celular. As imagens das células em cultura foram obtidas usando um microscópio de fluorescência confocal (Carl Zeiss LSM 710).

Análise Estatística:

Os resultados deste estudo foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM).

As respostas às diferentes doses de PIR foram avaliadas pela análise de variância de uma via (*ANOVA one way*), seguida pelo pós teste de *Student-Newman-Keuls*. Os resultados da quantificação da Cx43, tanto *in vivo* como *in vitro*, também foram avaliados pelo mesmo método estatístico.

Os valores de FC, PAM e as medidas do tono autonômico cardíaco (simpático e parassimpático) e FIMP foram comparados entre os grupos por meio do teste *t-Student*. A taxa de sobrevivência entre os animais infartados foi analisada pelo método de Kaplan-Meier e as comparações feitas pelo teste Mantel-Haenszel log-rank. As demais variáveis deste estudo, como atividade da acetilcolinesterase plasmática, FC, PA, QTc e intervalo PR tiveram suas alterações comparadas por meio da análise de variância de duas vias (*ANOVA two way*), para medidas repetidas, seguida pelo pós teste de *Student-Newman-Keuls* quando necessário. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Resultados

Perfil hemodinâmico dos ratos anestesiados e atividade da AChE:

Os ratos anestesiados com uretana (N=34) apresentaram FC de 438 ± 8 bpm e PAM de 95 ± 3 mmHg. Após a administração endovenosa de solução salina isotônica tanto a FC como a PAM permaneceram inalteradas (435 ± 11 bpm e 91 ± 5 mmHg, N=16). Entretanto, 1 h após o tratamento com PIR, não houve alteração na PAM (87 ± 3 mmHg), mas a FC foi significativamente menor (387 ± 7 bpm, N=18).

A atividade da acetilcolinesterase medida no plasma, 60 min após a administração endovenosa de PIR, sofreu uma redução de 12 ± 9 % em relação à sua atividade basal (figura 4). A administração de solução salina não alterou a atividade da acetilcolinesterase plasmática nos ratos anestesiados.

Tono autonômico cardíaco em ratos anestesiados:

A tabela 1 mostra a resposta de FC ao propranolol (tono simpático) e à metil-atropina (tono vagal), assim como a FIMP dos ratos tratados com salina ou PIR. Os ratos tratados com PIR apresentaram tono vagal aumentado e tono simpático marcadamente diminuído em comparação com os ratos tratados com salina. A FIMP foi semelhante entre os grupos.

Infarto do miocárdio em ratos anestesiados:

Uma vez que a oclusão coronariana foi realizada no ramo descendente anterior da coronária esquerda, a região da isquemia (área de risco de infarto) foi localizada principalmente na parede anterior do ventrículo esquerdo, como ilustrado na figura 5. A extensão do IM foi similar entre os grupos estudados: 47 ± 4 e 50 ± 4 % da circunferência da secção transversal do VE, em ratos tratados com PIR ou salina, respectivamente.

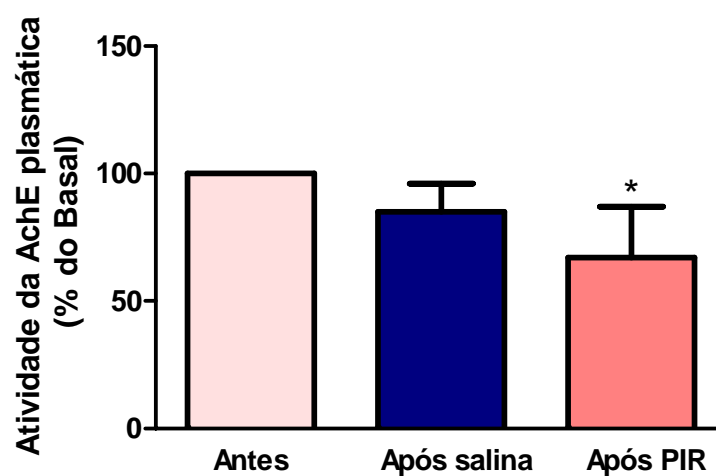


Figura 4. Atividade da acetilcolinesterase plasmática 1 hora após o tratamento com salina ou PIR. * $p < 0,05$ comparado ao grupo que recebeu salina.

Tabela 1: Valores da frequência cardíaca (FC) uma hora após a administração endovenosa de salina ou piridostigmina (PIR, 0,25 mg/kg). Também, resposta da FC ao propranolol (Tono simpático) e à metil-atropina (Tono vagal), assim como a FC na presença de ambos os bloqueadores autonômicos (FIMP).

	Salina	PIR
FC (bpm)	435 ± 11 (N=16)	387 ± 10 (N=18)
Tono simpático (Δ bpm)	- 69 ± 7 (N=6)	- 31 ± 8 * (N=8)
Tono vagal (Δ bpm)	44 ± 5 (N=10)	86 ± 7 * (N=10)
FIMP (bpm)	412 ± 6 (N=16)	410 ± 7 (N=18)

Média ± EPM; * p<0,05 comparado ao grupo tratado com salina.



Figura 5. Fatias (2 mm de espessura) do coração de um rato submetido à oclusão do ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda, e perfundido retrogradamente, através da aorta, com o corante Azul de Evans. A área clara (não corada) representa a área de isquemia nas diferentes fatias.

Taxa de sobrevivência dos animais infartados:

A quantidade de ratos que, após o IM, sobreviveram até o final do experimento (4 horas) foi notavelmente maior entre os que receberam PIR comparado àqueles que receberam salina (figura 6). Entretanto, a comparação estatística entre as curvas de sobrevivência, construídas pelo método estimador de Kaplan-Meier, não mostrou diferença significativa entre os 2 grupos estudados.

Respostas hemodinâmicas de ratos infartados:

Os valores da PAM e FC antes e após o IM, ou cirurgia fictícia, nos 3 grupos estudados estão mostrados na tabela 2. Também, a figura 7 ilustra as alterações (Δ) sofridas pela PAM e FC a cada hora após o IM, ou ligadura fictícia da artéria coronária. Imediatamente após o IM os ratos apresentaram uma acentuada queda na PA, de aproximadamente 40 mmHg, que se manteve ao longo das 4 horas avaliadas. O tratamento com PIR não afetou a hipotensão causada pelo IM. A cirurgia para a ligadura fictícia da artéria coronária também causou hipotensão, entretanto com menor magnitude que aquela provocada pelo IM.

O IM levou a um aumento da FC que se instalou 2 horas após a ligadura coronariana. O tratamento com PIR, logo após o IM, causou uma imediata bradicardia que diminuiu progressivamente, entretanto permanecendo significativa até 120 minutos após o IM.

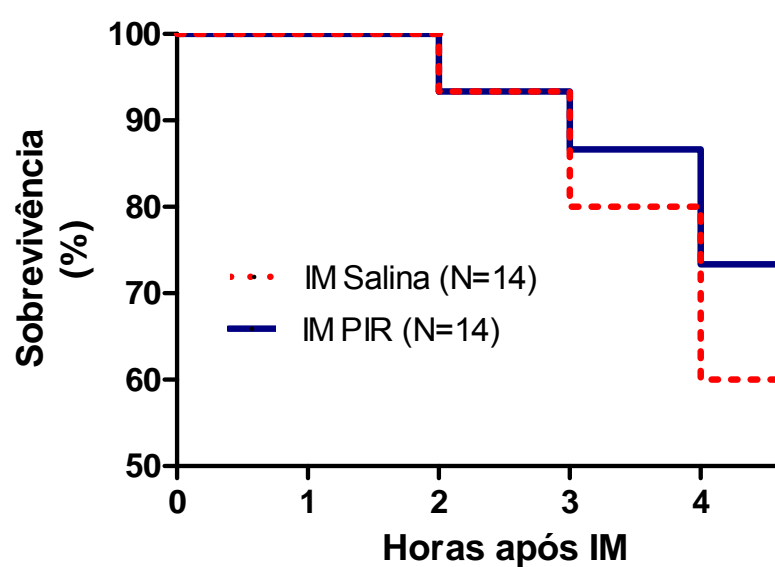


Figura 6. Curvas de sobrevivência nas primeiras 4 horas após o IM em ratos tratados com salina ou PIR. Método estimador de Kaplan-Meier.

Tabela 2: Valores da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes e 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após o IM, ou cirurgia fictícia, nos 3 grupos estudados.

	Antes	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min
PAM (mmHg)						
Sham	108 ± 6	84 ± 9	76 ± 8	76 ± 4	81 ± 2	75 ± 2
IM Salina	111 ± 2	78 ± 4	72 ± 3	65 ± 3	71 ± 3	63 ± 3
IM PIR	113 ± 3	69 ± 5	72 ± 4	65 ± 3	71 ± 4	69 ± 4
FC (bpm)						
Sham	429 ± 22	397 ± 29	402 ± 29	424 ± 28	442 ± 26*	442 ± 13
IM Salina	461 ± 8	435 ± 11	453 ± 11	478 ± 12	508 ± 10	491 ± 18
IM PIR	463 ± 6	360 ± 17*	413 ± 12	439 ± 9	459 ± 7	457 ± 5

Média ± EPM; * p<0,05 comparado ao IM salina.

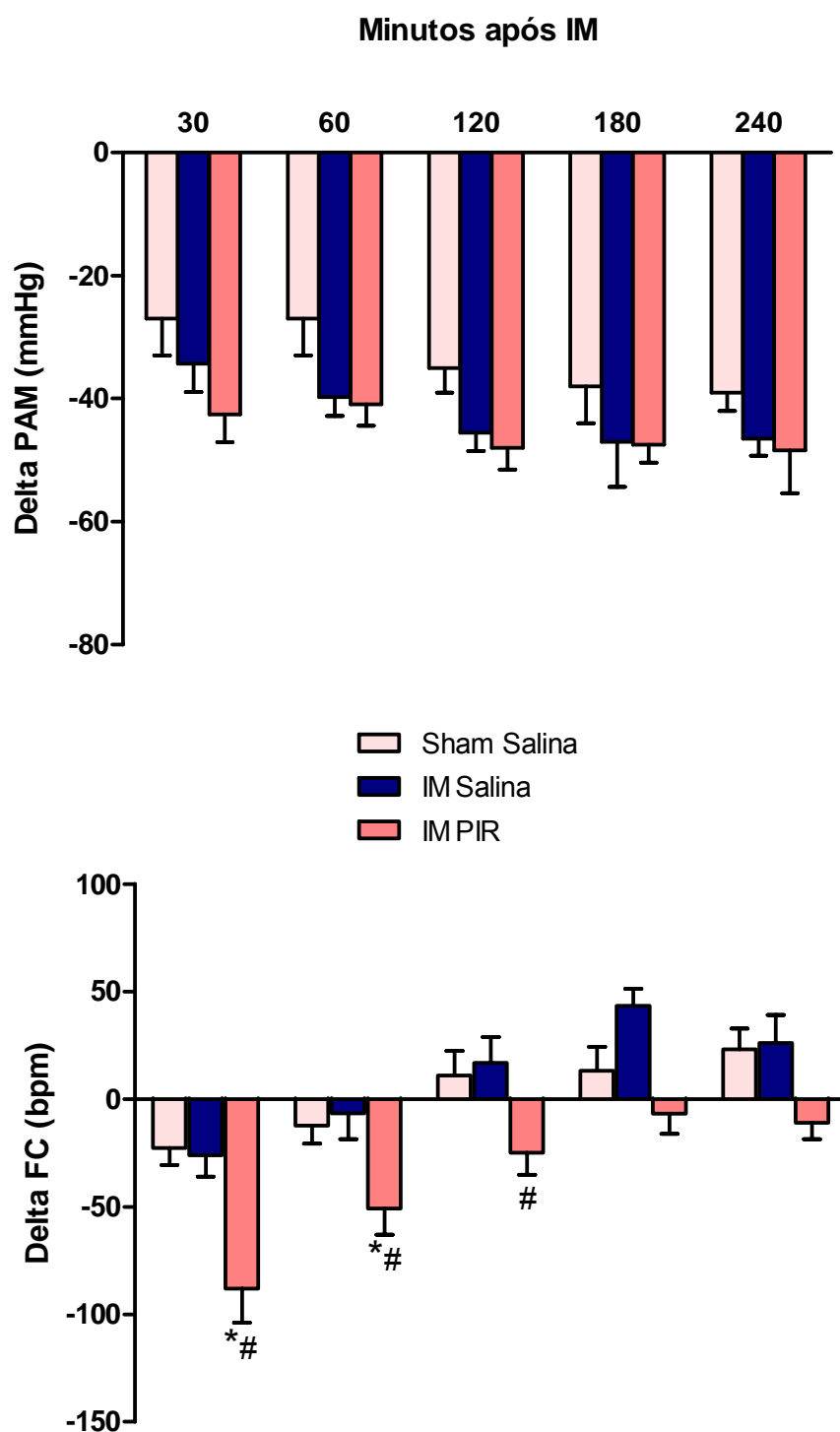


Figura 7. Média \pm EPM das alterações de pressão arterial média (PAM: painel superior) e frequência cardíaca (FC: painel inferior) durante as primeiras quatro horas após o infarto do miocárdio (IM), ou ligadura fictícia da coronária (Sham), nos 3 grupos de ratos estudados * $p < 0,05$ comparado ao grupo Sham; # $p < 0,05$ comparado ao grupo IM salina.

Variáveis eletrocardiográficas:

A figura 8 ilustra a variação (Δ) do intervalo QTc logo após (30 min) e ao final do experimento (240 min) após IM, ou ligadura fictícia da artéria coronária, em ratos anestesiados, tratados ou não com PIR. O IM causou um aumento do intervalo QTc em ambos os momentos avaliados. Por outro lado, o tratamento com PIR foi eficaz em prevenir este alargamento do intervalo QT. O tratamento com PIR não alterou o intervalo PR, cujas variações observadas nos períodos de 30 e 240 minutos após o IM também se encontram ilustrados na figura 8.

A partir do momento em que o IM foi realizado, abundantes episódios de arritmias foram observados nos ratos. Batimentos prematuros, isolados ou em salvas, bem como fenômenos arrítmicos mais complexos, como bigeminismo, bloqueios átrio-ventriculares, taquicardia ventricular (figura 9) e até mesmo períodos de fibrilação ventricular não sustentada foram observados durante todo o período que sucedeu a ligadura coronariana. Entretanto, os BVP isolados, além de serem os fenômenos arrítmicos mais fáceis de serem quantificados, foram a arritmia mais abundante em todos os ratos. Os 2 segmentos do ECG visualmente inspecionados no estudo, i.e. entre 30 e 60 min e entre 180 e 240 min após o IM, revelaram que: (1) 9 dos 14 ratos infartados que receberam somente salina apresentaram BVP enquanto apenas 7 dos 14 ratos com IM tratados com PIR tiveram arritmia. (2) o número de BVP presentes no ECG dos ratos com IM tratados com salina variou entre 1 e 29 por segmento analisado, enquanto apenas 1 a 4 BPV foram encontrados nos ratos com IM tratados com PIR.

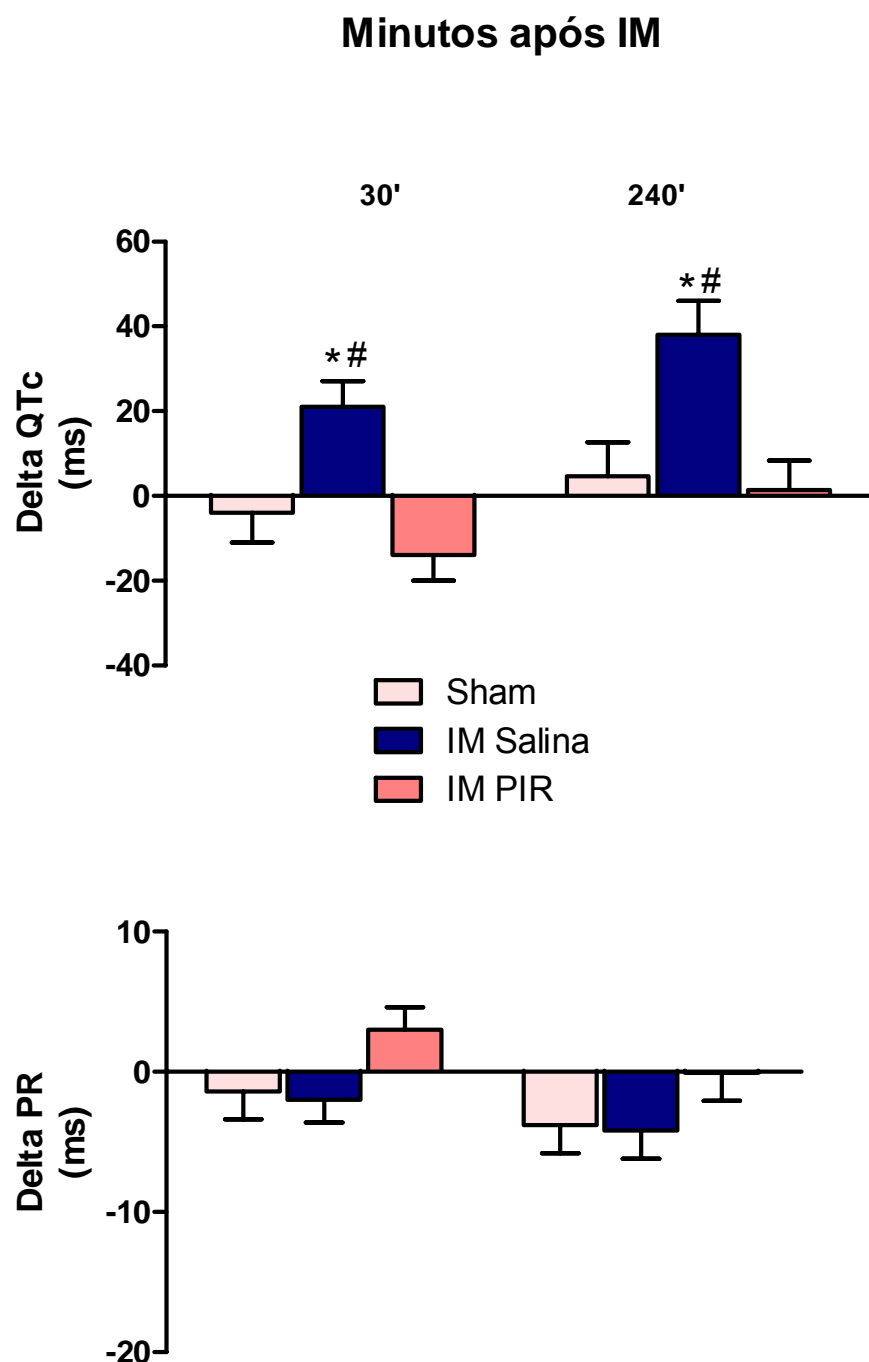


Figura 8. Média \pm EPM dos deltas do intervalo QTc (painel superior) e PR (painel inferior) nos 2 segmentos de ECG inspecionados (30 e 240 minutos após IM ou ligadura fictícia da coronária: Sham) em ratos tratados com salina ou piridostigmina (PIR). * $p < 0,05$ comparado ao grupo Sham; # $p < 0,05$ comparado ao grupo IM salina.

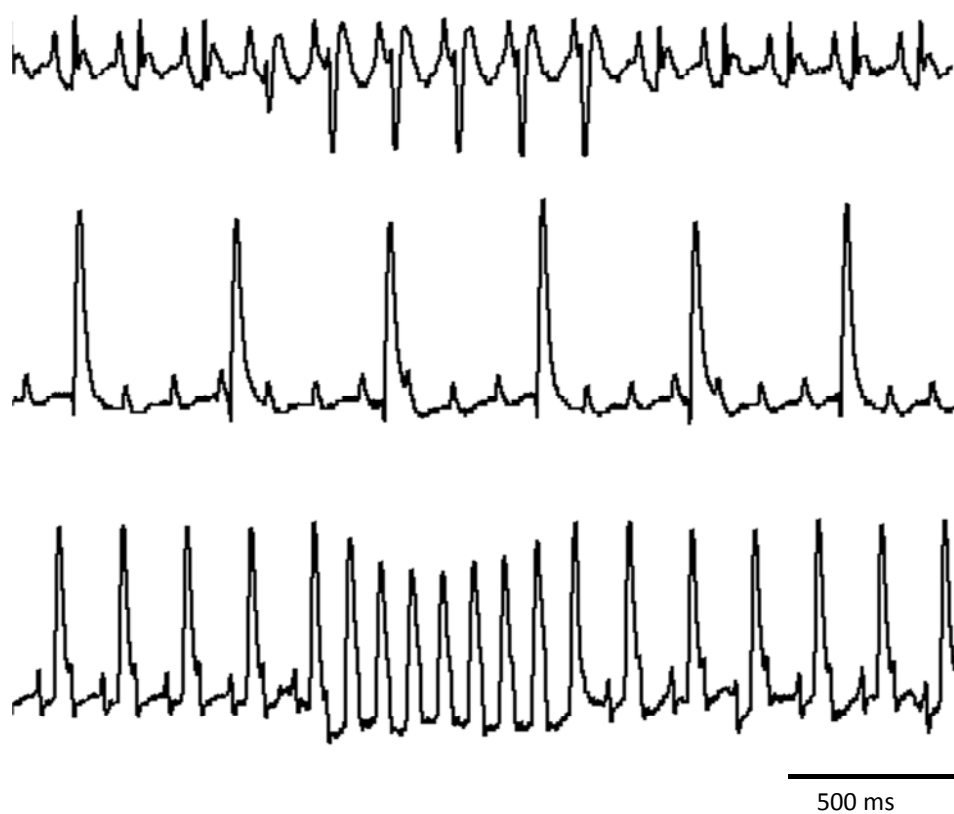


Figura 9. Eletrocardiograma de 3 ratos distintos mostrando exemplos de arritmias complexas como (acima), salvas de batimentos ectópicos ventriculares, (meio) bloqueio atrioventricular total e (abaixo) pequeno período de taquicardia ventricular não sustentada encontradas após o infarto do miocárdio.

Quantificação da Conexina 43 no coração de ratos infartados ou não, e tratados ou não com Piridostigmina:

A quantidade total da proteína Cx43 nos átrios não foi diferente entre os diferentes grupos de ratos estudados, i.e. ratos com ligadura fictícia da coronária e ratos com IM tratados ou não com PIR (figura 10). Esse achado era, de certa forma, esperado, uma vez que esta proteína é pouco presente nos átrios, onde a conexina 40 é a proteína predominante nas junções comunicantes atriais [Dhein e cols 2002]. Já a quantificação da Cx43 nos ventrículos direito e esquerdo (figuras 11 e 12) mostrou que o IM induziu uma redução na quantidade total desta proteína. Entretanto, nos ratos infartados que foram tratados agudamente com PIR, a quantidade da Cx43 foi semelhante àquela encontrada nos ventrículos dos ratos não infartados. Destaca-se que a análise estatística mostrou significância apenas entre os valores do ventrículo esquerdo.

Quantificação da Conexina 43 em cultura de cardiomiócitos submetidos, ou não, à “isquemia”:

O efeito da PIR, ou seja, da ação colinérgica sobre cardiomiócitos também foi avaliado, *in vitro*, em cultura celular de cardiomiócitos da linhagem H9c2. A figura 13 ilustra os resultados, e imagens representativas do *Western blot* para a Cx43 em cardiomiócitos da linhagem H9c2 submetidos, ou não, à “isquemia” durante 4 horas, e, tratados ou não, com PIR. A “isquemia” provocou uma redução significativa da quantidade de Cx43 em cardiomiócitos, tal qual aquela observada nos experimentos *in vivo*, e, o tratamento das células com PIR preveniu esta redução. É possível notar este fenômeno nas imagens de imunofluorescência (figura 14), onde as células controles e as células submetidas à “isquemia” e tratadas com PIR apresentam maior marcação, em verde, para Cx43 do que as células “isquêmicas” não tratadas.

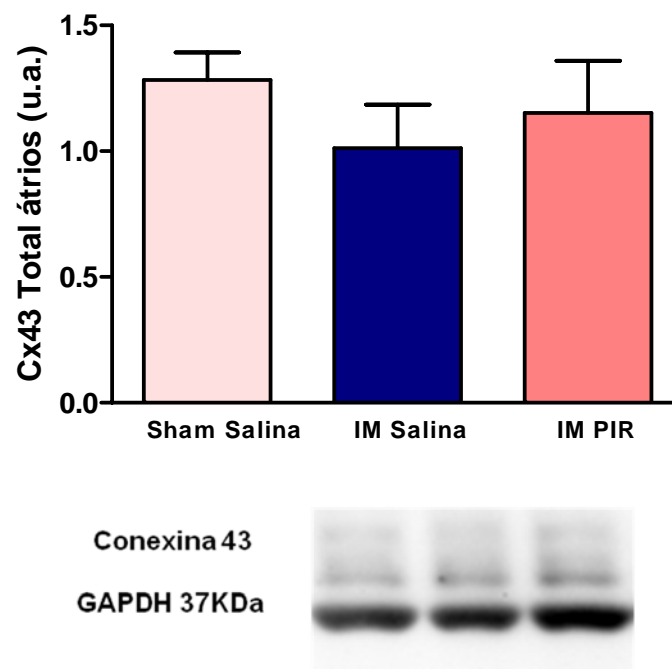


Figura 10. Expressão da proteína conexina 43 (Cx43), avaliada pelo método de *Western blot*, nos átrios dos corações de ratos com infarto do miocárdio (IM), tratados, ou não, com piridostigmina (PIR), ou submetidos apenas à ligadura coronariana fictícia (Sham). Abaixo, imagens representativas das bandas da reação de *Western blot*, os valores foram normalizados pela expressão de GAPDH.

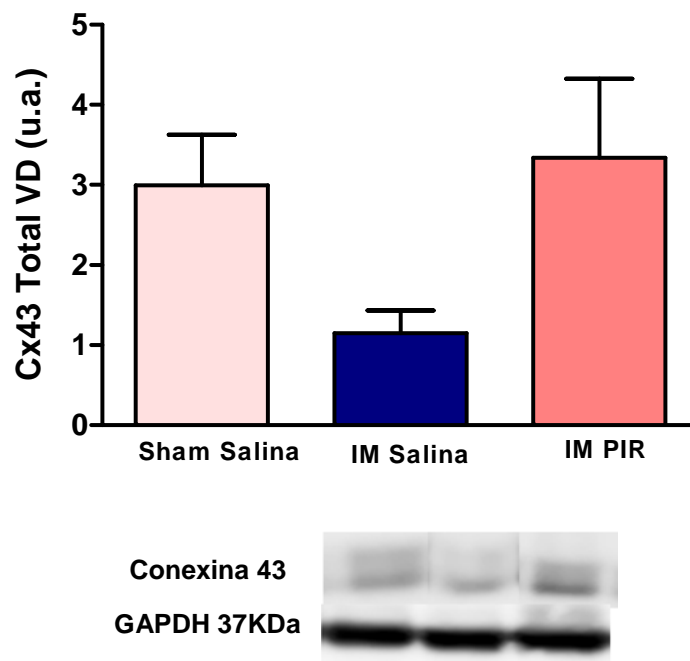


Figura 11. Expressão da proteína conexina 43 (Cx43), avaliada pelo método de *Western blot*, nos ventrículos direitos dos corações de ratos com infarto do miocárdio (IM), tratados, ou não, com piridostigmina (PIR), ou submetidos apenas à ligadura coronariana fictícia (Sham). Abaixo, imagens representativas das bandas da reação de *Western blot*, os valores foram normalizados pela expressão de GAPDH.

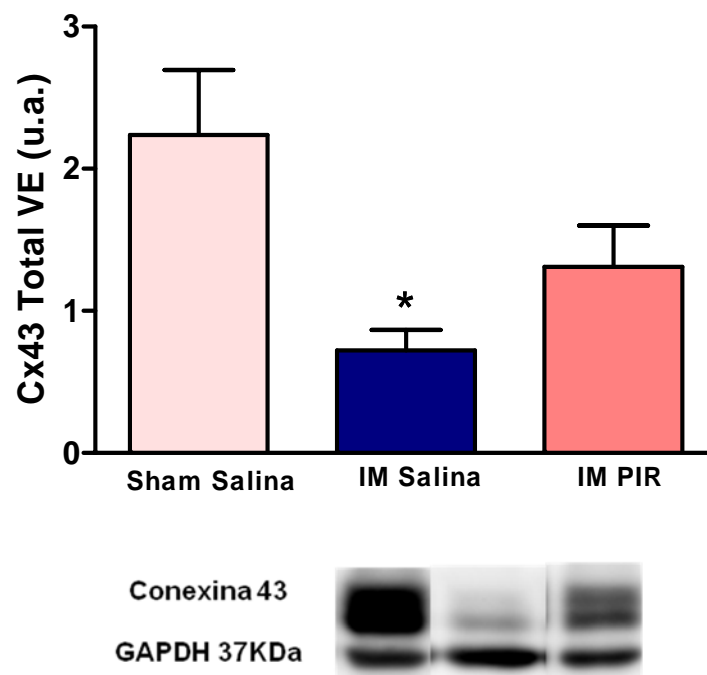


Figura 12: Expressão da proteína conexina 43 (Cx43), avaliada pelo método de *Western blot*, nos ventrículos esquerdos dos corações de ratos com infarto do miocárdio (IM), tratados, ou não, com piridostigmina (PIR), ou submetidos apenas à ligadura coronariana fictícia (Sham). Abaixo, imagens representativas das bandas da reação de *Western blot*, os valores foram normalizados pela expressão de GAPDH. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

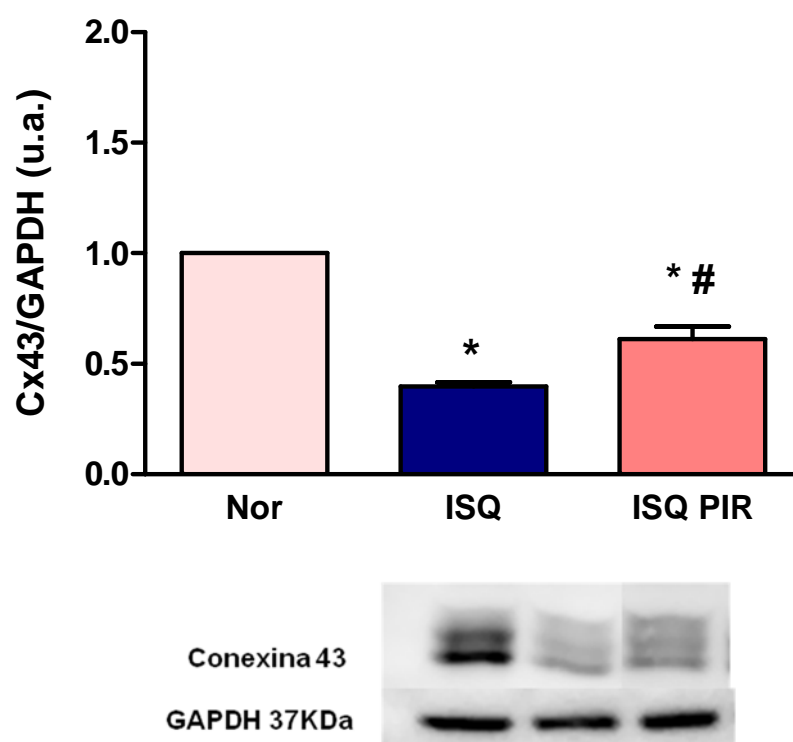


Figura 13: Expressão da proteína conexina 43 (Cx43), avaliada pelo método de *Western blot*, em cardiomiócitos da linhagem H9c2 submetidos, ou não à “isquemia” na presença ou ausência de PIR. Abaixo, imagens representativas das bandas da reação de *Western blot*, os valores foram normalizados pela expressão de GAPDH. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ comparado ao grupo isquemia 4h.

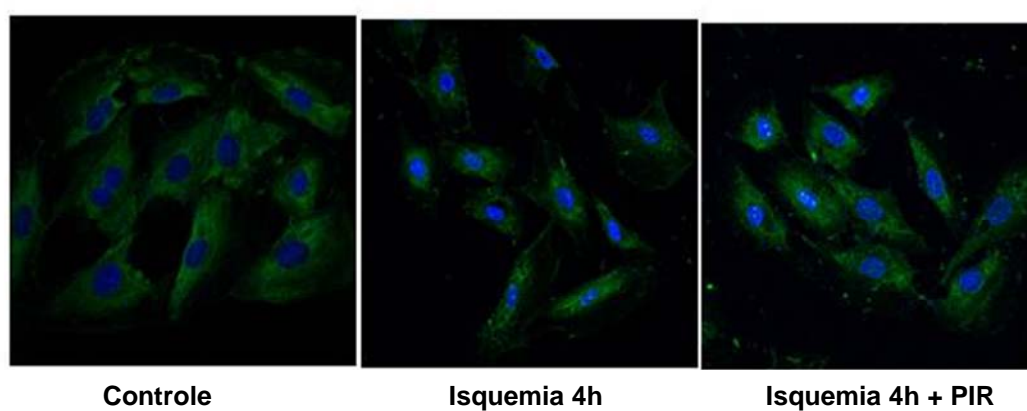


Figura 14. Fotomicrografias, em microscópio de fluorescência, de cardiomiócitos da linhagem H9c2 em cultura. A cor verde representa a marcação da conexina 43, enquanto o núcleo das células estão marcados em azul. Da esquerda para a direita vê-se cardiomiócitos em normóxia, em “isquemia” e em “isquemia” na presença de PIR.

Discussão

Este foi o primeiro estudo experimental a investigar o papel da administração aguda, endovenosa, de um agente anticolinesterásico, a PIR, em um modelo experimental de IM agudo. Assim, constatou-se que a administração endovenosa de PIR provocou: bradicardia, sem afetar a PAM; aumento do tono parassimpático cardíaco; preveniu o aumento do intervalo QTc em ratos infartados; diminuiu a incidência de BVP; aumentou a taxa de sobrevivência de ratos infartados e preveniu a degradação da Cx 43 no coração de ratos infartados e na cultura de cardiomiócitos submetidos à uma condição de isquemia.

Anestesia, tono autonômico cardíaco, e resposta hemodinâmica após administração de Piridostigmina:

Embora esteja bem estabelecido que a anestesia, de modo geral, é capaz de alterar a modulação autonômica cardiocirculatória bem como reduz notavelmente a sensibilidade dos reflexos cardiovasculares [Maggi e Meli 1986, Carruba e cols 1987], a instalação do processo isquêmico cardíaco é um fenômeno extremamente doloroso [Van de Werf e cols 2002, Bertrand e cols 2003]. Assim, embora seja tecnicamente possível realizar a oclusão coronariana aguda em ratos acordados, por questões de ética na experimentação animal, optamos por realizar o estudo em ratos sob efeito contínuo de anestesia geral. Entre os diversos agentes anestésicos disponíveis, a uretana foi escolhida porque, dependendo da dose e da via de administração utilizadas, seus efeitos depressores sobre os reflexos cardiocirculatórios são menores que aqueles causados por outros agentes anestésicos comumente utilizados [Brezenoff 1973, Maggi e Meli 1986].

Devido à escassez de estudos onde a PIR tenha sido administrada agudamente, por via endovenosa, no início do presente trabalho, diferentes doses dessa droga foram administradas a ratos anestesiados, a fim de avaliar os efeitos da PIR sobre a homeostase circulatória dos animais. Dentre as três doses de PIR avaliadas, a intermediária, de 0,25 mg/kg, foi escolhida para estudo em ratos infartados por ter provocado uma alteração cronotrópica cardíaca relativamente discreta (diminuição de 10 a 12% na FC basal).

Este é o primeiro estudo a demonstrar o efeito bradicárdico da PIR quando administrada endovenosamente, nessa dose, em ratos. Entretanto, o efeito cronotrópico negativo da PIR foi previamente demonstrado em diversos estudos, clínicos e experimentais, onde esta foi administrada oralmente, tanto a indivíduos saudáveis [Nóbrega e cols 1996, Catro e cols 2000, Nóbrega e cols 2000] quanto na condição de IM prévio [Behling e cols 2003, Lataro e cols 2013].

O efeito bradicardizante da PIR, muito provavelmente, é decorrente da potenciação da neurotransmissão parassimpática cardíaca, devido ao aumento da disponibilidade de acetilcolina na fenda sináptica causada por essa droga. Entretanto, antes de iniciar o estudo em ratos infartados, experimentos foram realizados para verificar o efeito da administração aguda de 0,25 mg/kg de PIR sobre o balanço simpato-vagal cardíaco de ratos anestesiados. Para isso, foi utilizado como índice do tono simpático e vagal, as respostas cronotrópicas ao bloqueio farmacológico dos receptores autonômicos no coração, técnica comumente utilizada para essa finalidade [Goldberger e cols 1999, Chapleau e Sabharwal 2011]. Embora muitos estudos que utilizaram essa mesma técnica tenham mostrado que o tono parassimpático é marcadamente maior que o

simpático em ratos acordados [Cunha e cols 1993, Mostarda e cols 2009, Chapleau e Sabharwal 2011], no rato anestesiado com uretana, os tonos simpático e vagal mostraram-se semelhantes. Assim, pode-se concluir que a uretana leva a uma disautonomia com aumento da atividade simpática, e diminuição da atividade parasimpática sobre o coração. Esta alteração autonômica pode ser uma das causas da elevada FC basal observada nos ratos deste estudo. O aumento da atividade simpática basal, induzido por diversos agentes utilizados para anestesia geral, entre eles a uretana, já foi observado em estudos prévios da literatura [Nedergaar 1973, Depocas e Behrens 1977, Carruba e cols 1987].

Entretanto, a administração de PIR causou uma bradicardia, pouco intensa, que se instalou imediatamente após a administração dessa droga e permaneceu por pelo menos 60 min, quando então os ratos receberam os bloqueadores autonômicos. Além da bradicardia, os ratos tratados com PIR apresentaram um tono vagal aumentado e, também, um tono simpático bastante reduzido em comparação aos ratos que receberam apenas salina. A bradicardia observada não foi acompanhada por qualquer alteração da PAM dos ratos. Então, acredita-se que a administração aguda de PIR, na dose escolhida para esse estudo, foi eficiente em provocar um estímulo farmacológico da atividade parassimpática cardíaca, mesmo em ratos sob influência da anestesia com uretana.

Piridostigmina e Infarto do Miocárdio:

Nos animais infartados foi observado que o tratamento com PIR também promoveu redução da FC basal desde os primeiros 30 minutos até a segunda

hora após o IM, contudo sem alterar a PAM. Este foi o primeiro estudo a caracterizar a taxa de sobrevivência de animais infartados tratados com PIR. Observou-se que ratos infartados que receberam salina apresentaram menor taxa de sobrevivência que ratos infartados tratados com PIR. E, apesar do método utilizado não mostrar significância estatística, é possível que o aumento no número de observações beneficie uma futura análise, visto que, como ilustra a figura 6, é clara a tendência da PIR em diminuir a mortalidade de ratos infartados.

Até onde se sabe, o número de estudos com experimentação animal onde PIR tenha sido administrada de forma aguda, ou durante um curto período de tempo, é extremamente reduzido [Chaney e cols 2002, Tuovinen e cols 1999, Soares e cols 2004]. Chaney e colaboradores [2002] mostraram que a administração aguda, intraperitoneal, de PIR, na dose de 2 mg/kg não alterou a FC. De forma semelhante, Soares e colaboradores [2004] mostraram que a administração de PIR na água de beber, por 7 dias, não alterou a FC nem a PA de ratos saudáveis, mas aumentou a variabilidade da FC. Tais contrastes com os resultados do presente estudo, onde foi observada notável bradicardia, provavelmente se devem a diferenças metodológicas. Por outro lado, também existem relatos onde o uso da PIR levou, assim como no presente estudo, à redução da FC. A administração de PIR, na água de beber, durante 4 semanas, induziu uma bradicardia significativa em ratos com IC, sem alterar a PAM, aumentou o tono parassimpático e diminuiu o tono simpático cardíaco [Lataro e cols 2013]. Além disso, também já foi reportado, em seres humanos, o efeito bradicardizante da PIR, tanto em indivíduos saudáveis [Pontes e cols 1999, Castro e cols 2000, Nóbrega e cols 2001], quanto em pacientes que

sofreram IM [Castro e cols 2002, Behling e cols 2003, Serra e cols 2009].

A inibição da acetilcolinesterase aumenta a disponibilidade de acetilcolina no terminal nervoso parassimpático [Taylor e cols 2001], e assim, aumenta a transmissão colinérgica nas células do nó sino atrial. Ademais, é possível que ação da acetilcolina sobre receptores muscarínicos localizados próximos ao terminal nervoso simpático pré-sináptico, capazes de inibir a liberação de noradrenalina [Levy e cols 1971, Vanhoutte e Levy 1980], diminua a atividade eferente simpática para o coração, e contribua, ainda mais, para a redução da atividade cronotrópica cardíaca.

Ratos infartados que não receberam o tratamento com PIR não apresentaram bradicardia, mas ao contrário, apresentaram uma tendência a aumentar a FC com o passar do tempo, após o IM. Esta taquicardia após o IM é consistente com achados prévios em animais modelos experimentais [Kolletis e cols 2007] e pacientes infartados [Webb e cols 1972]. Em geral, essa taquicardia está associada a um aumento da atividade simpática [Malliani e cols 1969, Webb e cols 1972] e uma diminuição da atividade parassimpática [Kirchheim e cols 1998] para o coração após o IM. Os ratos infartados tratados com PIR apresentaram, inicialmente, uma bradicardia e, apesar da FC ter retornado aos valores basais, não foi observada qualquer taquicardia após o IM nos ratos que receberam a droga.

Conforme mencionado anteriormente, existem evidências de que a atividade do sistema nervoso parassimpático predomine sobre a atividade do sistema simpático no nó sino atrial [Rosenblueth e Simeone 1934, Grodner e cols 1970, Vanhoutte e Levy 1980]. Entretanto, como também já descrito anteriormente, a estimulação parassimpática pode inibir a atividade simpática

[Levy 1971]. Neste sentido, num estudo realizado em cães, foi observado que quando um estímulo elétrico vagal foi feito concomitante a um estímulo elétrico simpático, a queda de FC atingida foi a mesma que quando da estimulação vagal sozinha [Levy e Zieske 1969]. De outro modo, Li e cols [2004] observaram uma diminuição da atividade simpática, por meio da dosagem de noradrenalina plasmática, em ratos com IC submetidos à eletroestimulação vagal durante 6 semanas. Também foi observado que a estimulação colinérgica farmacológica, por meio da administração de donepezila, um agente anticolinesterásico capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, reduziu a concentração plasmática de noradrenalina em ratos com IC [Okazaki e cols 2010]. Tais achados sugerem que a PIR, por potencializar a neurotransmissão colinérgica cardíaca (parassimpaticomimética), também tenha a capacidade de diminuir a hiperatividade simpática cardíaca decorrente do IM.

Piridostigmina e Eletrocardiograma em Ratos com IM:

O prolongamento do intervalo QT, e principalmente o intervalo QTc, que representa um retardo no tempo de repolarização ventricular, é comumente encontrado em situações patológicas como o IM, e representa um importante fator de risco para o desenvolvimento de arritmias ventriculares graves e morte súbita [Haynes e cols 1978, Ahnve e cols 1978, Schwartz e cols 1978]. No presente estudo, ratos infartados não tratados (salina) apresentaram um notável aumento do intervalo QTc. Entretanto, esse alargamento do intervalo QT não foi observado nos ratos infartados tratados com PIR. Corroborando os presentes achados já foi demonstrado que o tratamento com PIR diminuiu o intervalo QTc sem alterar o intervalo PR do ECG de pacientes com IM [Castro

e cols 2002]. Estudos da literatura mostraram que numa situação de esforço, como o exercício físico, a PIR também preveniu o aumento do intervalo QTc em pacientes com IM prévio [Castro e cols 2006]. Além disso, Castro e cols [2000] mostraram que a administração de PIR a indivíduos saudáveis diminuiu a dispersão do intervalo QTc, parâmetro que, tal qual a duração do intervalo QTc, também está relacionado ao aparecimento de arritmias e morte súbita [Ashikaga e cols 1998, Bruyne e cols 1998].

No presente estudo, a análise quantitativa das arritmias apresentadas pelos ratos foi feita apenas pela contagem de BVP isolados em segmentos de 2000 batimentos a cada hora após o IM. Não apenas o número de ratos infartados que apresentou arritmias foi menor dentre aqueles que receberam PIR, como também o número de BVP foi menor nos ratos tratados com PIR, comparados aos que receberam apenas salina. Poucos são os trabalhos que observaram o efeito da PIR sobre a arritmogênese [Behling e cols 2003] ou variáveis eletrocardiográficas associadas à arritmogênese, como, por exemplo, a duração do período refratário ventricular [Zimmerman e cols 2010]. Resultado semelhante aos do presente estudo foi observado por Behling e colaboradores [2003], que observaram que a administração oral de PIR, na dose de 30 mg/kg, 3 vezes ao dia, durante 2 dias, em pacientes com IC, diminuiu a incidência de BVP. Neste sentido, Zimmerman e cols [2010] sugeriram que o efeito antiarritmogênico da PIR esteja, em parte, associado à redução do período refratário ventricular, o qual foi observado em humanos, após a administração oral de 45 mg/kg de PIR.

Já foi demonstrado que a estimulação colinérgica cardíaca, por meio da eletroestimulação do nervo vago, diminuiu a incidência de fibrilação ventricular

(FV) em cães submetidos à isquemia miocárdica [Vanoli e cols 1991], e elevou o limiar de fibrilação ventricular no coração de coelhos submetidos à oclusão coronariana [Brack e cols 2011]. Além disto, acredita-se que este efeito antiarritmogênico da estimulação parassimpática pode estar relacionado à prevenção da degradação da proteína Cx43 no coração destes animais [Ando e cols 2005]. Pois como descrito anteriormente, a Cx43 está amplamente reduzida na isquemia induzida, *in vitro*, em cardiomiócitos [Ando e cols 2005, Zhang e cols 2006] e, *in vivo*, no IM [Peters e cols 1993]. Tal redução diminui o acoplamento célula-a-célula, diminui a velocidade de condução do potencial de ação cardíaco [Gutstein e cols 2001], e assim aumenta a incidência de taquiarritmias ventriculares [Lerner e cols 2000].

Piridostigmina e Conexina 43 em ratos com IM:

O presente estudo mostrou que o IM reduziu pela metade a quantidade de Cx43 total no ventrículo esquerdo de ratos infartados que receberam apenas salina. Por outro lado, a redução desta proteína no ventrículo esquerdo de ratos infartados e tratados com PIR não foi acentuada de igual maneira, sugerindo que a estimulação colinérgica farmacológica, por meio da administração endovenosa de PIR, preveniu a degradação da Cx43 no coração de ratos infartados. Já foram descritas diferentes vias de degradação da Cx43, como a via proteossomal, lisossomal, e fagolisossomal [Laing e Beyer 1995, Laing e cols 1997, Girão e Pereira 2003, Fong e cols 2012]. Há evidências também de que a degradação ocorra por autofagia dependente de ubiquitina [Marques e cols 2013, Ribeiro-Rodrigues e cols 2013]. Entretanto, faltam subsídios para aprofundar a discussão acerca dos mecanismos pelos quais a

acetilcolina previne a degradação da Cx43 numa condição de injúria tecidual, como na hipóxia, isquemia ou IM. Zhang e colaboradores [2006] mostraram, em cardiomiócitos da linhagem H9c2, que a hipóxia, durante 60 minutos, provocou redução da quantidade de Cx43 nestas células, e que o tratamento prévio com acetilcolina preveniu este efeito. Além disto, a presença de L-NAME, inibidor da síntese do NO, na cultura, inibiu este efeito protetor da acetilcolina sobre a Cx43, sugerindo que seu mecanismo protetor seja, em parte, mediado por esse gás. Os resultados do presente estudo corroboram os achados de Zhang e colaboradores [2006], visto que, analogamente, mostrou-se que o aumento da disponibilidade de acetilcolina, causada pela administração de PIR ao meio de cultura, preveniu a degradação da Cx43 na condição de “isquemia” durante 4 horas. Assim, é razoável considerar que a PIR, pode ter atuado como agente antiarrítmico, tanto aumentando a neurotransmissão colinérgica, quanto por meio de sua ação direta na maquinaria colinérgica já identificada em cardiomiócitos [Kakinuma e cols 2012, Rocha-Resende e cols 2012], uma vez que o fenômeno de prevenção da degradação da Cx 43 ocorreu mesmo na ausência de bradicardia. Vale ressaltar que apesar de conhecidas as diferenças estruturais e funcionais entre cardiomiócitos estudados *in vivo* e *in vitro*, acreditamos que, apesar destas limitações, os resultados obtidos com os experimentos na linhagem celular H9c2 forneceram informação suplementar acerca do efeito da piridostigmina sobre os cardiomiócitos.

Conclusões e Perspectivas

Primeiramente, foi demonstrado que a administração endovenosa aguda de PIR levou a uma bradicardia discreta, sem repercussões hemodinâmicas importantes. Mesmo sob efeito da anestesia pela uretana, situação onde existe uma alteração do balanço simpato-vagal cardíaco, o tratamento com PIR mostrou-se eficiente em promover um estímulo farmacológico da eferência vagal para o coração.

Após o IM, o uso agudo da PIR levou a uma melhora do perfil eletrocardiográfico dos ratos, refletido pela prevenção do aumento do intervalo QTc e pela redução da incidência de arritmias. E ainda, que este efeito antiarrítmico da PIR pode ser atribuído à prevenção da degradação da Cx 43 no coração de ratos infartados. Por fim, observou-se ainda uma ligeira tendência da PIR em aumentar a taxa de sobrevivência de ratos infartados.

PERSPECTIVAS: Uma vez que a estimulação elétrica do nervo vago mostrou-se benéfica na sobrevivência de animais com insuficiência cardíaca [Li e cols 2004, Zhang e cols 2009], bem como mostrou diminuir a incidência de arritmias em pacientes com doença arterial coronariana [Behling e cols, 2003], nosso laboratório realizou estudos no intuito de avaliar o papel da estimulação colinérgica cardíaca na IC [Lataro e cols 2013, Sabino e cols 2013], e agora, na fase aguda do IM.

Neste sentido, o presente estudo mostrou os benefícios do tratamento agudo com PIR no IM em ratos. Desse modo, tais achados podem indicar que o uso de um anticolinesterásico utilizado na fase aguda do IM, em pacientes, pode ser igualmente benéfica. Outrossim, os presentes resultados abrem um leque de questões acerca do mecanismo pelo qual a acetilcolina, direta ou

indiretamente, modula o metabolismo de proteínas essenciais (junções comunicantes) para a propagação adequada do potencial elétrico cardíaco, e assim, exerce seu papel antiarrítmico nas condições agudas e/ou crônicas do infarto do miocárdio. Neste sentido, é possível ainda realizar diversos estudos no âmbito da ação colinérgica sobre os processos de funcionamento e degradação de conexinas dos cardiomiócitos.

Referências Bibliográficas

AHNVE S, HELMERS C, LUNDMAN T, REHNQVIST N, SJÖGREN A. Qtc intervals in acute myocardial infarction: First-Year Prognostic Implications. *Clin Cardiol* 3:303-308, 1980.

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* 112:164-170, 2005.

ANVERSA P, LOUD AV, LEVICKY V, GUIDERI G. Left ventricular failure by myocardial infarction. I. Myocyte hypertrophy. *Am J Physiol* 248: H876-H882, 1985.

ASHIKAGA T, NISHIZAKI M, ARITA M, YAMAWAKE N, KISHI Y, NUMANO F, HIRAOKA M. Increased QTc dispersion predicts lethal ventricular arrhythmias complicating coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 8(15): 814-816, 1998.

BEHLING A, MORAES RS, ROHDE LE, FERLIN EL, NÓBREGA ACL, RIBEIRO JP. Cholinergic stimulation with pyridostigmine reduces ventricular arrhythmia and enhances heart rate variability in heart failure. *Am Heart J* 146: 494 –500, 2003.

BERTRAND ME, SIMOONS ML, FOX KA, WALLENTIN LC, HAMM CW, MCFADDEN E, DE FEYTER PJ, SPECCHIA G, RUZYLLO W. Task Force on the management of acute coronary syndromes of European Society of cardiology. *Eur Heart J* 23 (23): 1809-40, 2002.

BIGGER JT, DRESDALE RJ, HEISSEN BUTTEL RH, WELD FM, WIT AL. Ventricular arrhythmias in ischemic heart disease: mechanism, prevalence, significance, and management. *Prog Cardiovasc Dis* 19: 255-300, 1977.

BOLLI R, FISHER DJ, ENTMAN ML. Factors that determine the occurrence of arrhythmias during acute myocardial ischemia. *Am Heart J* 111: 261-270, 1986.

BRACK KE, COOTE JH, ANDRE NG G. Vagus nerve stimulation protects against ventricular fibrillation independent of muscarinic receptor activation. *Cardiovascular Research* 91: 437–446, 2011.

BREYER-PFAFF U, MAIER U, BRINKMANN AM, SCHUMM F. Pyridostigmine kinetics in healthy subjects and patients with myasthenia gravis. *Clin Pharmacol Ther*, 37(5): 495-501, 1985.

BREZENOFF HE. Cardiovascular responses to noradrenaline in the rat before and after administration of various anesthetics. *Br J Pharmac* 49:565-572, 1973.

BRUYNE MC, HOES AW, KORS JA, HOFMAN A, VAN BEMMEL JH, GROBBEE DE. Qtc dispersion predicts cardiac mortality in the elderly. *Circulation* 97: 467-472, 1998.

CAMPBELL RWF, MURRAY A, JULIAN DG. Ventricular arrhythmias in first 12 hours of acute myocardial infarction: natural history study. *Br Heart J* 46: 351-357, 1981.

CANYON SJ, DOBSON GP. Protection against ventricular arrhythmias and cardiac death using adenosine and lidocaine during regional ischemia in the in vivo rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1286–H1295, 2004.

CARRUBA MO, BONDILOTTI 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* 134:15-24, 1987.

CASADEI B, PAPILIS A, SESSA F, CONWAY J, SLEIGHT P. Low doses of scopolamine increase cardiac vagal tone in the acute phase of myocardial infarction. *Circulation* 88: 353-357, 1993.

CASTRO RRT, PORPHIRIO G, SERRA SM, NÓBREGA ACL. Cholinergic stimulation with pyridostigmine reduces the QTc interval in coronary artery disease. Pyridostigmine reduces QTc interval in coronary disease. *Braz J Med and Biol Res* 35: 685-689, 2002.

CASTRO RRT, SM SERRA, ACL NÓBREGA. Reduction of Qtc interval dispersion. Potential mechanism of cardiac protection of pyridostigmine bromide. *Arq Bras Cardiol*, 75 (3): 210-213, 2000.

CASTRO RRT, SM SERRA, PORFIRIO G, MENDES F, OLIVEIRA LPJ, NÓBREGA ACL. Pyridostigmine reduces QTc interval during recovery from maximal exercise in ischemic heart disease. *International Journal of Cardiology, Letter to the Editor*, 107: 138-139, 2006.

CHANEY LA, ROCKHOLD RW, HUME AS. Cardiorespiratory effects following acute exposure to pyridostigmine bromide and/or N,N-Diethyl-m-toluamide (DEET) in rats. *Int J of Toxicol* 21:287-300, 2002.

CHAPLEAU MW, SABHARWAL R. Methods of assessing vagus nerve activity and reflexes. *Heart Fail Ver* 16(2):109-127, 2011.

CHEN Y. Organophosphate-induced brain damage: Mechanisms, neuropsychiatric and neurological consequences, and potential therapeutics strategies. *Neurotoxicology* 33: 391-400, 2012.

CLARK C, FOREMAN MI, KANE KA, MCDONALD FM, PARRAT JR. Coronary artery ligation in anaesthetized rats as a method for the production of experimental dysrhythmias and for the determination of infarct size. *J. Pharmacol. Toxicol Methods* 3: 357-368, 1980.

COHN JN, LEVINE TB, OLIVARI MT, GARBERG V, LURA D, FRANCIS GS, SIMON AB, RECTOR T. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med*, 311: 819-823, 1984.

CORR PB, GILLIS A. Autonomic neural influences on the dysrhythmias resulting from myocardial infarction. *Circ Res* 43: 1-9, 1978.

CUNHA RS, CABRAL AM, VASQUEZ EC. Evidence that the autonomic nervous system plays a major role in the L-NAME-induced hypertension in conscious rats. *Am J Hypertens* 6(9): 806-809, 1993.

CURTIS MJ, MACLEOD BA, WALKER MJ. Models for the study of arrhythmias in myocardial ischaemia and infarction: the use of the rat. *J Mol Cell Cardiol*, 19: 399-419, 1987.

DEEDWANIA PC, SINGH BN, ELLELBOGEN K, FISHER S, FLETCHER R, SINGH S. Spontaneous conversion and maintenance of sinus rhythm by amiodarone in patients with heart failure and atrial fibrillation. *Circulation* 98: 2574-2579, 1998.

DEPOCAS F, BEHRENS. Effects of handling decapitation, anesthesia and surgery on plasma noradrenaline levels in the white rat. *Can J Physiol Pharmacol* 55:212, 1977.

DESAI MY, WATANABLE MA, LADDU AA, HAUPTMAN PJ. Pharmacologic modulation of parasympathetic activity in heart failure. *Heart Fail Rev*, 16:179-193, 2011.

DEWLAND TA, ANDRONE AS, LEE FA, LAMPERT RJ AND KATZ SD. Effect of acetylcholinesterase inhibition with pyridostigmine on cardiac parasympathetic function in sedentary adults and trained athletes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293: H86-H92, 2007.

DHEIN S, POLONTCHOUK L, SLAMEH A, HAEFLIGER JA. Pharmacological modulation and differential regulation of cardiac gap junction proteins connexin 43 and connexin 40. *Biol Cell* 94 (7-8): 409-422, 2002.

DI DIEGO JM AND ANTZELEVITCH C. Ischemic ventricular arrhythmias: Experimental models and their clinical relevance. *Heart Rhythm* 8 (12): 1963-8, 2011.

DIAS D. Ativação parassimpática pela piridostigmina na fase precoce da insuficiência cardíaca: efeito sobre a modulação autonômica e função cardíaca. Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, fevereiro 2012.

DOROGHAZI RM AND CHILDERS R. Time-related changes in the Q-T interval in acute myocardial infarction: possible relation to local hypocalcemia. *The Am J of Cardiol* 41: 684-688, 1977.

EMSLIE-SMITH D, SLADDEN GE, STIRLING GR. The significance of changes in the electrocardiogram in hypotermia. *Br Heart J*, 21: 343-351, 1959.

FELDER RB, FRANCIS J, WEISS RM, ZHANG Z, WEI S, JOHNSON AK. Neurohumoral regulation in ischemia-induced heart failure. *Neuro-cardiovascular regulation: from molecules to man. Annals of The New York Academy of Sciences*, 940: 444-453, 2001.

FERGUSON DW, BERG WJ, SANDERS JS. Clinical and hemodynamic correlates of sympathetic nerve activity in normal humans and patients with heart failure: evidence from direct microneurographic recordings. *J Am Coll Cardiol* 16: 1125-1134, 1990.

FIDLER LM, WILSON GJ, LIU F, CUI X, SCHERER SW, TAYLOR GP, HAMILTON RM. Abnormal connexin43 in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by plakophilin-2 mutations. *J Cell Mol Med* 13 (10): 4219-4228, 2009.

FONG JT, KELLS RM, GUMPERT AM, MARZILLIER JY, DAVIDSON MW, FALK MM. Internalized gap junctions are degraded by autophagy. *Autophagy* 8:794-811, 2012.

FRENNEAUX MP. Autonomic changes in patients with heart failure and in post-myocardial infarction patients. *Heart* 90: 1248-1255, 2004.

GIRÃO H, PEREIRA P. Phosphorylation of connexin 43 acts as a stimuli for proteasome-dependent degradation of the protein in lens epithelial cells. *MOL Vis* 9:24-30, 2003.

GOLDBERGER JJ. Sympathovagal balance: how should we measure it? *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 276: H1273-H1280, 1999.

GUTSTEIN DE, MORLEY GE, TAMADDON H, VAIDYA D, SCHNEIDER M, CHEN J, CHIEN KR, STUHLMANN HS, FISHMAN GI. Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac restricted inactivation of connexin 43. *Cir Res* 88: 333-339, 2001.

GUYTON AC, HALL JE. *Tratado de Fisiologia Médica*, 10 Ed. Rio de Janeiro-RJ, Guanabara Koogan, p.92-93 2002.

HARRIS AS. Delayed development of ventricular ectopic rhythms following experimental coronary occlusion. *Circulation* 1: 1318-1328, 1950.

HARTIKAINEN JEK, MALIK M. Distinction between arrhythmic and nonarrhythmic death after acute myocardial infarction based on heart rate variability, signal-averaged electrocardiogram, ventricular arrhythmias and left ventricular ejection fraction. *J Am Coll Cardiol*, 28(2):296-304, 1996.

HAYNES RE, HALLSTROM AP. Repolarization Abnormalities in Survivors of Out-of-Hospital Ventricular Fibrillation. *Circulation* 57 (4): 654-658, 1978.

HEIDBÜCHEL H, TACK J, VANNESTE L, BALLEST A, ECTOR H, VAN DE VERF F. Significance of arrhythmias during the first 24 hours of acute myocardial infarction treated with alteplase and effect of early administration of a β -blocker or a bradycardic agent on their incidence. *Circulation* 89: 1051-1059, 1994.

HEIDENREICH PA, LEE TT, MASSIE BM. Effect of beta-blockade on mortality in patients with heart failure: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 30(1):27-34, 1997.

HESCHELER J, MEYER R, PLANT S, KRAUTWURST D, ROSENTHAL W, SCHULTZ G. Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ Res* 69: 1476-1486, 1991.

HESKETH GG, SHAH MH, HALPERIN VL, COOKE CA, AKAR FG, YEN TE, KASS DA, MACHAMER CE, VAN EYK JE, TOMASELLI GF. Ultrastructure and regulation of lateralized connexin 43 in the failing heart. *Circ Res* 106: 1153-1163.

JAIN SK, SCHUESSLER RB, SAFFITZ JE. Mechanisms of delayed electrical uncoupling induced by preconditioning. *Circ Res* 92: 1138-1144, 2003.

JOHNS TNP, OLSON BJ. Experimental myocardial infarction. A method of coronary occlusion in small animals. *Annals of surgery* 140 (5): 675-682, 1954.

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* 61: 1340-1353, 1983.

KAKINUMA Y, AKIYAMA T, OKAZAKI K, ARIKAWA M, NOGUCHI T, SATO T. A non-neuronal cardiac cholinergic system plays a protective role in myocardium salvage during ischemic insults. *PLOS one* 7(11) :1-13, 2012.

KAPLINSKY E, OGAWA S, BALKE CW, DREIFUS LS. Two periods of early ventricular arrhythmia in the canine acute myocardial infarction model. *Circulation* 60: 397-403, 1979.

KAYE DM, LEFKOVITS J, JENNINGS GL, BERGIN P, BROUGHTON A, ESLER MD. Adverse Consequences of High Sympathetic Nervous Activity in the Failing Human Heart. *J Am Coll Cardiol* 26:1257-63, 1995.

KIMES BW, BRANDT BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res* 98: 367-381, 1976.

KIRCHHEIM HR. Systemic arterial baroreceptor reflexes. *Physiol Rev* 56: 100-176, 1976.

KLEIGER RE, MILLER JP, BIGGER JT JR, MOSS AJ. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 59(4): 256-262, 1987.

KOCHIADAKIS GE, MARKETOU ME, IGOUMENIDIS NE, SIMANTIRAKIS EN ET AL. Autonomic nervous system activity before and during episodes of myocardial ischemia in patients with stable coronary artery disease during daily life. *Pacing Clin Electrophysiol* 23(12): 2030-9, 2000.

KOLETTIS TM, AGELAKI MG, BALTOGIANNIS GG, VLAHOS AP, MOUROUZIS I, FOTOPOULOS A, PANTOS C. Comparative effects of acute vs. chronic oral amiodarone treatment during acute myocardial infarction in rats. *Europace*, 9: 1099-1104, 2007.

KUPPER W, BLEIFELD W, HANRATH P, MATHEY D, EFFERT S. Left ventricular hemodynamics and function in acute myocardial infarction: Studies during the acute phase, convalescence and late recovery. *Am J Cardiol* 40: 900-905, 1977.

LA ROVERE MT, BIGGER JT JR, MARCUS FI, MORTARA A, SCHWARTZ PJ. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. *Lancet* 351: 478-484, 1998.

LAINING JG, BEYER EC. The gap junction protein connexin 43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *The J of Biol Chem* 270 (44): 26399-26403, 1995.

LAINING JG, TADROS PN, WESTPHALE EM, BEYER EC. Degradation of connexin 43 gap junctions involves both proteasome and lysosome. *Exp Cell Res* 236: 482-492, 1997.

LAMPE PD, LAU AF. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arc of Bio and Bioph* 384 (2): 205-215, 2000.

LATARO RM, SILVA CA, FAZAN JR R, PRADO CM, ROSSI MA, SALGADO HC. Increase in parasympathetic tone by pyridostigmine prevents the ventricular dysfunction during the onset of heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Physiol* 305(8):908-916, 2013.

LAYISH I, KRIVOY A, ROTMAN E, FINKELSTEIN A, TASHMA Z. Pharmacologic prophylaxis against agent nerve poisoning. *IMAJ* 7:182-187, 2005.

LERNER DL, YAMADA KA, SCHUESSLER RB, SAFFITZ JE. Accelerated onset and increased incidence of ventricular arrhythmias induced by ischemia in Cx43-deficient mice. *Circulation* 101: 547-552, 2000.

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* 109: 120-124, 2004.

LI ZHANG, CHAO-QIAN XU, YUAN HONG, JIA-LIN ZHANG, YING LIU, MEI ZHAO, YAN-XIU CAO, YAN-JIE LU, BAO-FENG YANG, HONG-LI SHAN. Propranolol regulates cardiac transient outward potassium channel in rat myocardium via cAMP/PKA after short-term but not after long-term ischemia. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 382:63–71, 2010.

LOWEL H, A DOBSON, U KEIL, B HERMAN, MS HOBBS, A STEWART, M ARSTILA, H MIETTINEN, H, MUSTANIEMI AND J TUOMILEHTO. Coronary heart disease case fatality in four countries. A community study. The Acute Myocardial Infarction Register Teams of Auckland, Augsburg, Bremen, FINMONICA, Newcastle, and Perth. *Circulation* 88: 2524-2531, 1993.

MALLIANI A, SCHAWARTZ PT, ZANCHETTI A. A sympathetic reflex elicited by experimental coronary occlusion. *Am J of Physiol* 217 (3):703-309, 1969.

MARK AL. Sympathetic dysregulation in heart failure: mechanisms and therapy. *Clin Cardiol* 18 (suppl I): I3-I8, 1995.

MARQUES T, MARQUES C, RIBEIRO-RODRIGUES T, MATAFOME P, PEREIRA P, GONÇALVES LM, GIRÃO H. To beat or not to beat: Detrimental autophagy contributes to gap junctions degradation in ischemic heart. *Eur Heart J* 34 (Abstract Supplement): 158, 2013.

MIMICA N, PRESECKI P. Side effects of approved antidementives. *Psychiatria Danubina* 21(1):108-113, 2009.

MOON CH, JUNG Y, KIM MH, PARK RM, LEE SH, BAIK EJ. Protein kinase c inhibitors attenuate protective effect of high glucose against hypoxic injury in H9c2 cardiac cells. *Jap J of Physiol* 50: 645-649, 2000.

MOSTARDA C, ROGOW A, SILVA ICM, LA FUENTE RN, JORGE L, RODRIGUES B, HEEREN MV, CALDINI EG, DE ANGELIS K, IRIGOYEN MC. Benefits of exercise training in diabetic rats persist after three weeks of detraining. *Aut Neuros: Bas and Clin* 145: 11-16, 2009.

MUSIL LS, GOODENOUGH D. Biochemical analysis of connexin 43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *The Journal of Cell Biol* 115 (5): 1357-1374, 1991.

NARKIEWICZ K AND SOMERS VK. Sympathetic nerve activity in obstructive sleep apnoea. *Acta Physiol Scand* 177: 385–390, 2003.

NEDERGAARD OA. Cocaine-like effect of ketamine on vascular adrenergic neurones. *Eur J Pharmacol* 23(2):153-61, 1973.

NIELSEN BL. ST-segment elevation in acute myocardial infarction. Prognostic importance. *Circulation* 48: 333-345, 1973.

NÓBREGA ACL, CARVALHO ACG, BASTOS BG. Resting and reflex heart rate response during cholinergic stimulation with pyridostigmine in humans. *Braz J Med Biol Res* 29: 1461-1465, 1996.

NÓBREGA ACL, REIS AF, MORAES RS, BASTOS BG, FERLIN EL, RIBEIRO JP. Enhancement of heart rate variability by cholinergic stimulation with pyridostigmine in healthy subjects. *Clin Aut Res* 11:11-17, 2001.

NOLAN J, BATIN PD, ANDREWS R, LINDSAY SJ, BROOKSBY P E COLS. Prospective Study of Heart Rate Variability and Mortality in Chronic Heart Failure. *Circulation* 98:1510-1516, 1998.

OKAZAKI Y, ZHENG C, LI M. Effect of the cholinesterase inhibitor donepezil on cardiac remodeling and autonomic balance in rats with heart failure. *J Physiol Sci* 60:67-74, 2010.

ODEMUYIWA O, MALIK M, FARRELL T, BASHIR Y, POLONIECKI J, CAMM J. Comparison of the predictive characteristics of heart rate variability index and left ventricular ejection fraction for all-cause mortality, arrhythmic events and sudden death after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 15; 68(5):434-9, 1991.

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* 92: 253-26, 1995.

PANTRIDGE JF, WEBB SW, ADGEY AA. Arrhythmias in the first hours of acute myocardial infarction. *Prog Cardiovasc Dis* 23: 265-278, 1981.

PEDRETTI RFE, COLOMBO E, BRAGA SS, BALLARDINI L, CARU B. Effects of oral pirenzepine on heart rate variability and baroreceptor reflex sensitivity after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 25: 915-921, 1995.

PETERS NS, GREEN CR, POOLE-WILSON PA, SEVERS NJ. Reduced content of connexin 43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human hearts. *Circulation* 88:864-875, 1993.

PFEFFER MA, PFEFFER JM, FISHBEIN MC, FLETCHER PJ, SPADARO J, KLONER RA, BRAUNWALD E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Cir Res* 44: 503-512, 1979.

POELZING S AND ROSENBAUM DS. Altered connexin43 expression produces arrhythmia substrate in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1762–H1770, 2004.

PONTES PV, BASTOS BG, ROMEO FILHO LJ, MESQUITA ET, NOBREGA AC. Cholinergic stimulation with pyridostigmine, hemodynamic and echocardiographic analysis in healthy subjects. *Arq Bras Cardiol* 72: 297-306, 1999.

RAHIMTOOLA SH, DIGILLO MM, EHSANI A, LOEB HS, ROSEN KM, GUNNER RM. Changes in left ventricular performance from early after acute myocardial infarction to the convalescent phase. *Circulation* 46: 770-779, 1972.

RIBEIRO-RODRIGUES T, MARQUES C, MARQUES T, PINHEIRO A, MATAFOME P, GONÇALVES LM, GIRÃO H. Ubiquitin induces interference in communication: Ubiquitination of Cx43 leads to Gap Junction degradation in ischemic heart. *Eur Heart J* 34 (Abstract Supplement): 315-316, 2013.

ROCHA-RESENDE C, ROY A, RESENDE R, LADEIRA MS, LARA A, GOMES ERM, PRADO VF, GROS R, GUATIMOSIN C, PRADO MAM, GUATIMOSIN S. Non neuronal cholinergic machinery present in cardiomyocytes offsets hypertrophic signals. *J Mol Cell Cardiol* 53: 206-216, 2012.

SATO T, NAKATSUKA H. Anticholinesterases; peripheral and central effects. *Masui* 62(1):19-26, 2013.

SANTOS FM, DIAS DPM, SILVA CAA, FAZAN JR R, SALGADO HC. Sympathetic activity is not increased in L-NAME hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: R89-R95, 2010.

SAPOLSKY RM. The stress of Gulf war syndrome. *Nature* 393 (28):308-309, 1998.

SCHWARTZ PJ, DE FERRARI GM, SANZO A, LANDOLINA M, RORDORF R, RAINERI C, CAMPANA C, REVERA M E COLS. Long term vagal stimulation in patients with advanced heart failure. First experience in man. *European Journal of Heart Failure* 10: 884–891, 2008.

SCHWARTZ PJ, LA ROVERE MT, VANOLI E. Autonomic nervous system and sudden cardiac death: experimental basis and clinical observations for post-myocardial infarction risk stratification. *Circulation* 85 (suppl I): I-77-I-91, 1992.

SCHWARTZ PJ, WOLF S. QT interval prolongation as predictor of sudden death in patients with myocardial infarction. *Circulation* 57 (6): 1074-1077, 1978.

SMITH WT, FLEET WF, JOHNSON TA, ENGLE CL, CASCIO WE. The Ib phase of ventricular arrhythmias in ischemic in situ porcine heart is related to changes in cell-to-cell electrical coupling. *Circulation* 92 (10): 3051-60, 1995.

SOARES PPS, NÓBREGA ACL, USHIZIMA MR, IRIGOYEN MCC. Cholinergic stimulation with pyridostigmine increases heart rate variability and baroreflex sensitivity in rats. *Aut Neurosc: Bas and Clin* 113: 24 – 31, 2004.

SROKA K, PEIMAN CJ, SEEVERS H. Heart Rate Variability in Myocardial Ischemia During Daily Life. *Journal of Electrocardiology* 30 (1): 45-56, 1997.

STEFAN SILBERNAGL E FLORIAN LANG, FISIOPATOLOGIA texto e atlas, Ed. Artmed, Porto Alegre, p.220, 2006.

TAYLOR P. Anticholinesterase agents. In: Goodman and Gilman's, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, edited by Hardman JG, Limbird LE and Gilman AG. New York: McGraw-Hill, 175-192, 2001.

THOMAS A. DEWLAND, ANA SILVIA ANDRONE, FORRESTER A. LEE, RACHEL J. LAMPERT, STUART D. KATZ. Effect of acetylcholinesterase inhibition with pyridostigmine on cardiac parasympathetic function in sedentary adults and trained athletes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H86–H92, 2007.

VAN DE WERF F, ARDISSINO D, BETRIU A, COKKINOS DV, FALK E, FOX KAA, JULIAN D, LENGYEL M, NEUMANN FJ, RUZYLLO W, THYGESEN C ET AL. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *European Heart Journal* 24: 28-66, 2003.

VAN RIJEN HVM, ECKARDT D, DEGEN J, THEIS M, OTT T, WILLECK K, JONGSMA HJ, OPTHOF T, BAKKER JMT. Slow conduction and enhanced anisotropy increase the propensity for ventricular tachyarrhythmias in adult mice with induced deletion of connexin 43. *Circulation* 109: 1048-1055, 2004.

VUYST ED, BOENGLER K, ANTOONS G, SIPIDO KR, SCHULZ R, LEYBAERT L. Pharmacological modulation of connexin-formed channels in cardiac pathophysiology. *British Journal of Pharmacology* 163: 469-483, 2011.

VYBIRAL T, GLAESER D, MORRIS G, HESS KR, YANG K, FRANCIS M, PRATT CM. Effects of low dose transdermal scopolamine on heart rate variability in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 22: 1320-26, 1993.

VANOLI E, DE FERRARI GM, STRAMBA-BADIALE M, HULL SS JR, FOREMAN RD, SCHWARTZ PJ. Vagal stimulation and prevention of sudden death in conscious dogs with healed myocardial infarction. *Circulation Research* 68: 1471-1481, 1991.

WAXMAN MB AND RW WALD. Termination of Ventricular Tachycardia by an Increase in Cardiac Vagal Drive. *Circulation* 56:385-391, 1977.

WEBB SW, ADGEY AAJ, PANTRIDGE JF. Autonomic disturbance at onset of acute myocardial infarction. *British Medical Journal*, 3:89-92, 1972.

WILLEM JK, VERDINO RJ, GOTTDIENER JS, O'LEARY ST, MERZ CNB, KRANTZ DS. Changes in Heart Rate and Heart rate Variability Before Ambulatory Ischemic Events. *Journal of the American College of Cardiology* 38(3): 451-6, 2001.

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 Kisko, NY: Futura Publishing Co. 267-337, 1993.

WIT AL, JANSE MJ. Ventricular arrhythmias in the acute phase of myocardial ischemia and infarction. In: Wit AL, Janse MJ, eds. *The Ventricular Arrhythmias of Ischemia and Infarction: Electrophysiological Mechanisms*. Mount Kisko, NY: Futura Publishing Co.174-260, 1993.

YOON MS, HAN J, TSE WW, ROGERS R. Effects of vagal stimulation, atropine, and propranolol on fibrillation threshold of normal and ischemic ventricles. *American Heart Journal* 93 (1): 60-5, 1977.

ZEHENDER M, UTZOLINO S, FURTWÄNGLER A, KASPER W, MEINERTZ T, JUST H. Time course and interrelation of reperfusion-induced ST changes and ventricular arrhythmias in acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 68: 1138-1142, 1991.

ZHANG Y, KAKINUMA Y, ANDO M, KATARE RG, YAMASAKI F, SUGIURA T, SATO T. Acetylcholine Inhibits the Hypoxia-Induced Reduction of Connexin43 Protein in Rat Cardiomyocytes. *J Pharmacol Sci* 101: 214 – 222, 2006.

ZHANG Y, OPOVIĆ ZB, BIBEVSKI S, FAKHRY I, SICA DA, WAGONER DRV, MAZGALEV TN. Chronic vagus nerve stimulation improves autonomic control and attenuates systemic inflammation and heart failure progression in canine high-rate pacing model. *Circ Heart Fail*, 2:692-699, 2009.

ZIPES DP AND WELLENS HJJ. Sudden Cardiac Death. *Circulation* 98:2334-2351, 1998.

ZUCKER IH, WANG W, BRANDLE M, SCHULTZ HD, PATEL KP. Neural regulation of sympathetic nerve activity in heart failure. *Prog Cardiovasc Dis* 37: 397-414, 1995.

Manuscrito

Effect of pyridostigmine on hemodynamics and arrhythmias after acute myocardial infarction in anesthetized rats.

Fernanda Machado dos Santos, Carlos Alberto Aguiar da Silva, Helio Cesar Salgado, Rubens Fazan Jr.

Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Running Head: Pyridostigmine in acute myocardial infarct.

Key Words: parasympathetic stimulation; anticholinesterase agent; myocardial infarction; autonomic imbalance; arrhythmias.

Contact information:

Rubens Fazan Junior, M.D., Ph.D.

Department of Physiology

School of Medicine of Ribeirão Preto-USP

Av. Bandeirantes 3900

14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Phone: +55-16-36023331

E-mail: rfazan@usp.br

ABSTRACT

The effect of intravenous administration of the cholinesterase inhibitor pyridostigmine (PYR) on cardiac sympathovagal balance was evaluated by heart rate (HR) responses to the autonomic receptor blockers, methylatropine and propranolol, in normal rats. Moreover, PYR was given 10-15 min after acute myocardial infarction (MI) in urethane anesthetized rats under continuous recording of arterial pressure (AP) and ECG. Uretane anesthetized rats treated with PYR (0.25 mg/kg) showed a marked bradycardia (-45 ± 9 bpm). As compared with animals that received saline, PYR treated rats showed reduced cardiac sympathetic (31 ± 6 vs 67 ± 9 bpm) and increased vagal tone (86 ± 7 vs 44 ± 5 bpm). MI elicited a fall in AP (-45 ± 5 mmHg), progressive rise in HR (26 ± 14 bpm) and an increase in QTc interval (33 ± 13 ms). PYR did not affect the hypotensive response but elicited a prompt bradycardia (-50 ± 14 bpm) that returned to basal level over time. No tachycardia was observed after MI in PYR-treated rats. Lengthening of QTc interval was also prevented by PYR. Intravenous PYR administration also reduced the incidence of premature ventricular beats (PVB) after MI from 78% (in untreated rats) to 50%. Moreover, untreated rats showed 29 PVB per 2,000 beats after MI, while PYR allowed a maximum of 4 PVB per 2,000 beats. PYR also tended to increase the survival rate after MI. In conclusion, acute treatment with PYR elicited a marked shift in sympatho-vagal balance towards parasympathetic side and it was able to reduce the incidence of arrhythmias and prevented the lengthening of QT interval after acute MI.

INTRODUCTION

Myocardial infarction (MI) is one of the major causes of death in industrialized societies and also in societies under development (1). There are epidemiological evidences that 50% of patients die in the first hours after MI, before receiving any medical support (2). Most of these deaths are caused by ventricular arrhythmias, which are observed in both humans (3) and experimental models of MI (4,5,6). Myocardial ischemia and infarct is always accompanied by marked autonomic imbalance characterized by sympathetic overactivity (3,7) and vagal withdrawal (8). Previous studies have shown that autonomic alterations may precede the MI (8,9,10). It is well established that sympathetic overactivity is associated with higher risk of cardiovascular events (7,3), nevertheless, reduced vagal drive to the heart has been considered an independent risk factor for life-threatening arrhythmias and sudden cardiac death (11).

Therefore, it has been argued that parasympathetic activation may have beneficial implications after MI (12). Previous studies have demonstrated that electrical stimulation of vagal nerve improved myocardial performance, reduced the incidence of arrhythmias and restored the cardiac autonomic control, extending survival in experimental models of MI (13,14). Therefore, the increase in parasympathetic function seems to be a reliable therapeutic alternative for preventing the MI outcomes. However, because vagal nerve stimulation is an invasive procedure, pharmacological agents that augment the availability of acetylcholine at the neuroeffector junction is expected to have beneficial effect and should be considered as an alternative therapy. Therefore, agents that inhibit the activity of plasma acetylcholinesterase have been used in experimental designs aiming to elicit a pharmacological enhancement of parasympathetic influences on the heart (15). Increase in cholinergic action by edrophonium, an anticholinesterase inhibitor, was demonstrated to reduce the incidence of ventricular tachycardia in patients (16). Pyridostigmine (PYR), a reversible anticholinesterase inhibitor that does not cross the blood-brain barrier and acts particularly in the peripheral synaptic cleft, seems to be potentially useful in this context (17). When administered to healthy humans during one or two days, PYR induced bradycardia (18,19). In patients with heart failure, PYR reduced the heart rate (HR) (20) and the ventricular arrhythmia density (21).

These findings suggest that PYR can modulate the cardiac sympathovagal balance under physiological condition and also in patients that suffered MI.

An electrocardiographic abnormality commonly found right after MI is the lengthening of the QT interval and the QT interval corrected by HR (QTc) (22,23,24,25). These abnormalities are associated with higher incidence of ventricular arrhythmias (23,24,25). PYR decreased the QTc interval in patients with MI (20) and reduced the incidence of life-threatening cardiac arrhythmias (21).

Therefore, our hypothesis was that the early arrhythmogenic phase of MI could be offsetted by the enhancement of cholinergic activity to the heart by the administration of a vagomimetic agent. Since, to our knowledge, there is no report about the effect of PYR in the early phase of MI, we propose to investigate, in anesthetized rats, the effects of the acute administration of PYR on hemodynamics, ECG and in the incidence of arrhythmias in the first hours following MI.

METHODS

All experimental procedures were carried out in accordance with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals [Dept. of Health, Education and Welfare, Publication No. (NIH) 85-23, Revised 1985; Office of Science and Health Reports, DRR/NIH, Bethesda, MD]. The experimental protocols were approved by the Committee of Ethics in Animal Research of the Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo (protocol no. 177/2011).

Animals

Experiments were performed in adult male Wistar rats (280-350 g) maintained on a 12/12h light/dark cycle and housed individually with free access to food and water.

Protocol 1: Cardiac Autonomic tone and Acetylcholinesterase activity

Rats were anesthetized with urethane (Ethyl carbamate, 1 g/kg, ip Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) and placed on a heating pad (Insight

Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, SP, Brazil) in order to maintain the core body temperature between 36 and 37 °C. Animals were instrumented with subcutaneous electrodes for electrocardiogram (ECG) recording and polyethylene catheters (Intramedic, Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) were inserted into femoral artery and vein for arterial pressure (AP) measurement and drug administration, respectively. Electrodes were connected to a differential amplifier (CL-615422-1, Gould Instruments Systems, Cleveland, OH, USA) to record ECG and the arterial line was connected to a pressure transducer (MLT0380/D, ADInstruments, Sydney, Australia). ECG and AP were continuously sampled (500 Hz) in an IBM/PC equipped with an analogic-to-digital interface (DI-720 Dataq System, Akron, OH, EUA). After basal recordings, the rats received an intravenous injection of saline (NaCl 0.9%, N=16) or PYR (0.25 mg/kg, Valeant Pharmaceuticals, Campinas, SP, Brazil, N=18). One hour after saline or PYR administration the rats were treated with the cardiac autonomic receptor blockers methy-atropine (1 mg/kg, iv) and propranolol (2 mg/kg, iv), 15 min apart from each other. Half of the rats in each group (saline or PYR) received the autonomic blockers in the opposite order, i.e., propranolol followed by methyl-atropine. In order to confirm the anticholinesterase effect of PYR, two small group of rats treated with saline (N=4) or PYR (N=4) had a sample of arterial blood withdrawn to measure the plasmatic acetylcholinesterase (AChE) activity.

Acetylcholinesterase Activity: A blood sample (300 µL) was collected from the arterial catheter before and one hour after the treatment with saline or PYR. Blood samples were collected in vials containing 30 µL of EDTA (0.1M, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After centrifugation (3000 g, 4 °C) for 20 min, plasma was collected and kept at -20 °C until the determination of AChE activity. Enzymatic assays were performed using an adaptation of the colorimetric method (26), as described by Alves-Amaral et al (27). Plasma samples (10 µL) were incubated in 96-well microplates with 5,5'-dithio-bis (0.01 M, 2-nitrobenzoic acid, DTNB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and excess of substrate (acetylthiocholine, 0.075 M, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 0.2 mM phosphate buffer, pH 8.0 at 30 °C, in the presence of the selective inhibitor of butyrylcholinesterase, tetraisopropylpyrophosphoramidate (IsoOMPA

10^{-3} M, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Synthesis of the reaction product was followed in a microplate reader (BioTek FL600, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) at 405 nm, for 45 min, at 3 min intervals. Velocity of the reaction for each sample was determined in duplicate and expressed as arbitrary units per min per mL of plasma.

Protocol 2: Myocardial Infarction

Initially, animals were anesthetized and instrumented as described in the first protocol. After twenty minutes of basal recordings, animals were endotracheally intubated and supplied by a mechanical ventilator (Harvard Apparatus rodent respirator, model 680, Holliston, MA, USA) attached to a system of continuous measurement of the expired carbon dioxide (Micro Capstar End-tidal CO₂ Analyser, CWe, Ardmore, PA, USA). MI was produced according to the method described by Johns and Olson [1954] (28). Briefly, a left thoracotomy was performed to expose the heart, the pericardium was removed, and the heart was exteriorized. The left anterior descending coronary artery was ligated (polyester suture 4-0; Ethicon, São José dos Campos, SP, Brazil). The heart was returned to the chest cavity, and the thorax incision was suture closed. After coronary ligation, rats were randomized to groups that received, intravenously, PYR (N=14) or saline (N=14) ten minutes after the MI. All variables were continuously recorded during 4 hours after MI. Mechanical ventilation was withdrawn between the 1st and 2nd hour after coronary ligation, when the animals were able to breathe spontaneously keeping the end-tidal CO₂ below 6%.

Measurement of the extent of myocardial infarction: After finishing the experiments, hearts were excised and the Evans' blue dye (0.5%) was retrograded flushed through the ascending aorta at a flow rate of 18 mL/min to demarcate the ischemic risk zone, i.e., the myocardial area not reached by the blue dye (figure 1). Following, the heart was transversely cut into six slices of uniform thickness (2 mm) using a custom-made, equal-spaced blade slicer. The slices were digitally scanned, and the extension of ischemic risk zone was measured in each slice using the public-domain software NIH ImageJ (available

on the internet site <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Infarct size was calculated dividing the length of infarcted area by the total circumference of the LV, and expressed as percentage.

Only rats with an ischemic risk zone > 35% of the left ventricular wall were considered in the study.

Data Analysis

AP, ECG and expired CO₂ recordings were analyzed off line. Beat by beat based series of mean arterial pressure (MAP) and HR (calculated from RRi intervals) were generated.

HR changes elicited by methyl-atropine and propranolol were measured and considered as indexes of vagal and sympathetic cardiac tonic influences, respectively. HR showed in the presence of both autonomic blockers, i.e., without autonomic influences, was considered as intrinsic pacemaker HR (i-HR), i.e. HR without the influence of autonomic eference (29).

Segments of ECG with 2,000 beats each were selected from the whole recording of each rat submitted to MI from basal period (before MI) and 30, 60, 120, 180 and 240 minutes (min) after MI. Each segment was visually inspected in order to detect and quantify premature ventricular beats (PVB). Moreover, segments of ECG recorded between 30 and 60 min, and between 180 and 240 min were processed by the LabChart module for ECG Analysis (LabChart, ADInstruments, Sydney, Australia) to measure changes in PR interval and QT segment corrected by RR interval [QTc, Bazett formula: $QT \text{ interval} / \sqrt{(RR \text{ interval})}$].

Statistical Analysis

Data are reported as means \pm SEM. Differences in sympatho-vagal balance, plasmatic AChE activity and the size of myocardial infarction were compared between groups by Student's t test. Hemodynamic and electrocardiographic variables in infarcted rats were tested between groups by two way analysis of variance (ANOVA 2 way) adjusted for repeated measures, followed by Newman-Keuls comparison test. The survival rate between infarcted rats was analyzed by means of Kaplan-Meier method and

comparisons made by the Mantel-Haenszel log-rank test. Differences were considered significant at a value of $p < 0.05$.

RESULTS

Cardiac autonomic tone: Urethane anesthetized rats showed basal HR of 438 ± 8 bpm (N=34). One hour after saline administration HR was found unaltered (435 ± 11 , N=16) while PYR treated rats presented a marked bradycardia (387 ± 7 bpm, N=18). MAP was found similar in rats treated with PYR or saline (87 ± 3 and 91 ± 5 mmHg). Figure 2 shows HR responses to propranolol (sympathetic tone) and methyl-atropine (vagal tone), as well as i-HR 60 min after treatment with PYR or saline. Rats treated with PYR presented smaller sympathetic and higher parasympathetic cardiac tone. Intrinsic pacemaker HR was found similar between groups.

Acetylcholinesterase activity: The plasma AChE activity was reduced (12 ± 9 %; $p < 0,05$) 60 min after PYR administration. Saline did not affect the plasma AChE activity.

Myocardial Infarction: We studied 28 rats with MI: 14 received saline while 14 were treated with PYR. As the occlusion was performed in the left coronary artery, the area of ischemia (ischemic risk zone) was located mostly in the anterior wall of the left ventricle. The MI size was similar between groups (Saline 47 ± 4 % vs PYR 50 ± 4 %). The survival rate estimated by Kaplan-Meier method did not show statistical significance, even though only 8 out of 14 rats treated with saline survived up to 4 h after MI, whilst 10 out of 14 rats treated with PYR were alive at the end of the experiment (figure 3).

Hemodynamics: Figure 4 shows MAP and HR changes after acute MI in rats treated with PYR or saline. MI elicited a prompt fall in MAP that was not affected by PYR administration. Saline treated rats showed a rise in HR over time after MI. Similarly to non infarcted urethane anesthetized rats, infarcted rats also showed a marked bradycardia after intravenous administration of PYR.

Nevertheless, the bradycardia elicited by PYR slowly recovered, reaching baseline levels at the end of the experiment. Differently from non-treated rats, no tachycardia was seen in infarcted rats that received PYR.

Electrocardiographic variables: Figure 5 presents changes (Δ) in QTc interval shortly after MI (30 min) and at the end of the experiment (240 min) in rats treated with PYR or saline. MI induced a lengthening of QTc interval in non-treated rats, but not in the ones that received PYR. Basal PR interval was 50 ± 1 ms (N=28) and no change in this interval was found after MI in rats treated with PYR (50 ± 1 ms, N=14) or saline (46 ± 3 ms, N=14).

Some arrhythmias, such as self-limited periods of ventricular tachycardia and ventricular fibrillation, were often seen during the first 30 min after coronary ligation. Following this first 30 min, multifocal isolated PVB were the main arrhythmic phenomena seen in both groups of rats with MI. Nevertheless, among non-treated rats, 78% showed PVB while only 50% of the rats treated with PYR presented PVB. Moreover, at each analyzed period of ECG (2,000 beats every hour), rats with MI treated with saline showed up to 29 PVB while MI rats treated with PYR showed a maximum of 4 PVB per 2,000 beats. Figure 6 shows some arrhythmias records from a rat with MI.

DISCUSSION

The following study showed that PYR induced bradycardia without affect AP; increased cardiac parasympathetic tone; prevented the lengthening of QTc interval; reduced the incidence of cardiac arrhythmia and also determined a trend to increase the survival rate after MI.

This is the first study evaluating the effect of an acetylcholinesterase inhibitor, i.e., a vagomimetic agent, right after MI in rats. As a reversible anticholinesterasic agent, PYR has been widely used in the treatment of *myasthenia gravis* (30). However, some authors have recently examined other potential beneficial effects of this drug in some pathophysiological conditions, such as MI and heart failure (20, 21). The most prominent effect of PYR in the present study was a prompt bradycardia observed immediately after its administration in healthy anesthetized rats. Nevertheless, the magnitude of the

fall in HR elicited by PYR (10-15% of baseline HR) was not enough to cause important circulatory changes what would certainly affect the results with infarcted rats. In fact, due to the lack of studies that administrated PYR intravenously, previous experiments (data not shown) were performed in order to determine a dose of PYR used in this study.

Pyridostigmine and Cardiac Sympathovagal balance in healthy anesthetized rats:

The HR responses to cardiac autonomic receptor blockers showed that acute administration of PYR in urethane anesthetized rats is effective to elicit a marked shift in cardiac sympathovagal balance toward the vagal side. In the absence of any sympathetic or parasympathetic drive, the sinus node fires at its intrinsic rate (29), which was not different between groups. Lataro et al [2013] (31) showed that chronic administration of PYR in rats subjected to MI increased vagal and reduced sympathetic tone without changing i-HR.

Hemodynamics after myocardial infarction:

The hypotension observed immediately after acute MI is in line with other studies of experimental MI in rats (4,32) and is attributed to the impairment of myocardial performance due to the acute infarct (32,33,34). PYR did not affect the hypotension after MI. On the other hand, PYR elicited a prompt bradycardia that slowly recovered over time. Several studies showed bradycardia elicited by PYR in both healthy subjects (35,36,37) and infarcted patients (20,21). However, to our knowledge, only few experimental studies evaluated the hemodynamic effects of acute administration of PYR, i.e., during hours or until one week (38,39). No hemodynamic changes (39), or pressure rise (38) were observed in response to PYR. Such differences may be due to different methodological approaches, such as administration pathways and doses. Meanwhile, in line with the present results, the administration of PYR in drinking water during 4 weeks induced a significantly bradycardia in rats with heart failure (31). Infarcted rats not treated with PYR showed a progressive rise in HR that reached a plateau 2-3 h after coronary ligation. Tachycardia after acute MI is consistent with previous experimental (6) and clinical findings (3). This

tachycardia might be due to a sympathetic overactivity (3,7) and a cardiac vagal withdraw after MI (40).

Electrocardiographic responses:

Many clinical evidences have reported a lengthening of QTc interval after MI (23,25), which is considered a predictor of cardiac sudden death (24). In the present study, infarcted rats treated with saline presented a lengthening of QTc interval. PYR prevented the lengthening of the QTc interval in rats with MI, and did not affect the PR interval. In line with our findings, Castro and co-workers showed that PYR shortened the QTc interval of healthy subjects (36) and patients with chronic MI (20). Moreover, PYR reduced the QTc interval during recovery from maximal exercise in ischemic heart disease (41).

There are only few studies aiming to evaluate the antiarrhythmic effect of electrical vagal stimulation during MI. In the present study, the administration of PYR 10 minutes after MI reduced the incidence of PVB. The pharmacological enhancement of the cholinergic activity to the heart by means of PYR administration also reduced the incidence of arrhythmias in patients with heart failure (21) and also in patients with arrhythmias not related with MI (16). Zimmerman et al. [2010] suggested that the antiarrhythmic effect of PYR could be, in part, related to reduction of the refractory ventricular period, which was found shorter in humans after a single dose of PYR (42).

There are evidences that cholinergic stimulation, by means of vagal nerve electrical stimulation, reduced the incidence of ventricular fibrillation in conscious dogs subjected to ischemia (43), and also reduced the ventricular fibrillation threshold in hearts of rabbits subjected to coronary artery ligation (44). Furthermore, it is argued that this antiarrhythmic effect of parasympathetic activity could be due to the prevention of cell-to-cell electrical uncoupling of ventricular myocytes by preventing the degradation of connexin 43 (Cx43), which is the most important protein of ventricular gap junctions (45).

The present study showed that PYR reduced the incidence of cardiac arrhythmias in rats after acute MI. There are some evidences showing that enhanced vagal drive to the heart, by means of vagal nerve stimulation (45) or pharmacological stimulation with acetylcholine (46), prevented the reduction of Cx43, which may be involved in the reduced number of arrhythmic events in

those studies. Moreover, it appears that this beneficial antiarrhythmic role of acetylcholine does not depend on its bradycardic effect, since studies have already shown that vagal stimulation prevented the reduction of Cx43 in cardiomyocytes (45) and reduced the incidence of arrhythmias without inducing bradycardia (44). These findings corroborate our results, since we showed that PYR induced a significantly bradycardia until 3 hours after treatment, but the antiarrhythmic effect persisted until 4 hours after MI.

PERSPECTIVES

First we investigated the effects of acute treatment with pyridostigmine bromide on cardiac autonomic tone of healthy urethane anesthetized rats, and also its effects on hemodynamics and ECG during the first 4 hours after coronary artery ligation in anesthetized rats. It was found that PYR reduced the sympathetic and increased the vagal tone to the heart. Furthermore, the main results obtained were that PYR reduced the incidence of arrhythmias in MI rats, which could be related to conformational alterations of some proteins responsible for maintaining the membrane stability of cardiomyocytes. Thus, the next step of the present study will be to investigate whether PYR could modulate the metabolism of connexins, and if so, if it could be involved in the antiarrhythmic effect of pyridostigmine bromide. Some experiments were performed in hearts subjected to myocardial infarction, and it has been observed an important trend to PYR to prevent connexins degradation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Rubens Fernando de Melo from the Department of Physiology of the School of Medicine of Ribeirão Preto (University of São Paulo), for the histological support, and Prof. Celso Rodrigues Franci.

Grants

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

1. World Health Organization Available <http://www.who.int/en>. Accessed 06 December 2013.
2. Lowel H, Dobson A, Keil U, Herman B, Hobbs MS et al. (1993) Coronary heart disease case fatality in four countries. A community study. The Acute Myocardial Infarction Register Teams of Auckland, Augsburg, Bremen, FINMONICA, Newcastle, and Perth. *Circulation* 88: 2524-2531.
3. Webb SW, Adgey AAJ, Pantridge JF (1972) Autonomic disturbance at onset of acute myocardial infarction. *BMJ* 3:89-92.
4. Johnston KM, MacLeod BA, Walker MJ (1983) Responses to ligation of a coronary artery in conscious rats and the actions of antiarrhythmics. *Can J Physiol Pharmacol* 61: 1340-1353.
5. Opitz CF, Mitchell GF, Pfeffer MA, Pfeffer JM (1995) Arrhythmias and Death After Coronary Artery Occlusion in the Rat: Continuous Telemetric ECG Monitoring in Conscious, Untethered Rats. *Circulation* 92: 253-261.
6. Kolettis TM, Agelaki MG, Baltogiannis GG, Vlahos AP, Mourouzis I et al. (2007) Comparative effects of acute vs. chronic oral amiodarone treatment during acute myocardial infarction in rats. *Europace*, 9: 1099-1104.
7. Malliani A, Schwartz PT, Zanchetti A (1969) A sympathetic reflex elicited by experimental coronary occlusion. *Am J Physiol* 217(3): 703-309.
8. Sroka K, Peiman CJ, Seevers H (1997) Heart Rate Variability in Myocardial Ischemia During Daily Life. *J Electrocardiol* 30(1): 45-56.
9. Kochiadakis GE, Marketou ME, Igoumenidis NE, Simantirakis EN et al. (2000) Autonomic nervous system activity before and during episodes of myocardial ischemia in patients with stable coronary artery disease during daily life. *Pacing Clin Electrophysiol*. Dec 23(12): 2030-9.
10. Willem JK, Verdino RJ, Gottdiener JS, O'Leary ST, Merz CNB et al. (2001) Changes in Heart Rate and Heart rate Variability Before Ambulatory

- Ischemic Events. *J Am Coll Cardiol* 38(3): 451-6.
11. Hartikainen JE, Malik M, Stauton A, Poloniecki J, Camm J (1996) Distinction Between Arrhythmic and Nonarrhythmic Death After Acute Myocardial Infarction Based on Heart Rate Variability, Signal-Averaged Electrocardiogram, Ventricular Arrhythmias and Left Ventricular Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol* 28(2): 296-304.
 12. De Ferrari G and Schwartz PJ. (2011) Vagus nerve stimulation: from pre-clinical to clinical application: challenges and future directions. *Heart Fail Rev* 16: 195-203.
 13. Li M, Zheng C, Sato T, Kawada T, Sugimachi M et al. (2004) Vagal Nerve Stimulation Markedly Improves Long-Term Survival After Chronic Heart Failure in Rats. *Circulation* 109: 120-124.
 14. Zheng C, Li M, Inagaki M, Kawada T, Sunagawa K et al. (2005) Vagal stimulation markedly suppresses arrhythmias in conscious rats with chronic heart failure after myocardial infarction. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 7: 7072-7075.
 15. Desai MY, Watanabe MA, Laddu AA, Hauptman PJ (2011) Pharmacologic modulation of parasympathetic activity in heart failure. *Heart Fail Rev* 16:179-193.
 16. Waxman MB and Wald RW (1977) Termination of Ventricular Tachycardia by an Increase in Cardiac Vagal Drive. *Circulation* 56: 385-391.
 17. Taylor P (2001) Anticholinesterase agents. In: Goodman and Gilman's, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, edited by Hardman JG, Limbird LE and Gilman AG. New York: McGraw-Hill. pp.175-192.
 18. Dewland TA, Androne AS, Lee FA, Lampert RJ, Katz SD (2007) Effect of acetylcholinesterase inhibition with pyridostigmine on cardiac parasympathetic function in sedentary adults and trained athletes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H86-H92.

19. Nóbrega ACL, Carvalho ACG, Bastos BG (1996) Resting and reflex heart rate response during cholinergic stimulation with pyridostigmine in humans. *Braz J Med Biol Res* 29: 1461-1465.
20. Castro RRT, Pofirio G, Serra SM, Nóbrega ACL (2002) Cholinergic stimulation with pyridostigmine reduces the QTc interval in coronary artery disease. Pyridostigmine reduces QTc interval in coronary disease. *Braz J Med Biol Res* 35: 685-689.
21. Behling A, Moraes RS, Rohde LE, Ferlin EL, Nóbrega ACL et al. (2003) Cholinergic stimulation with pyridostigmine reduces ventricular arrhythmia and enhances heart rate variability in heart failure. *Am Heart J* 146: 494-500.
22. Doroghazi RM and Childers R (1977) Time-Related Changes in the Q-T Interval in Acute Myocardial Infarction: Possible Relation to Local Hypocalcemia. *Am J Cardiol* 41: 684-688.
23. Haynes RE and Hallstrom AP (1978) Repolarization Abnormalities in Survivors of Out-of-Hospital Ventricular Fibrillation. *Circulation* 57(4): 654-658.
24. Schwartz PJ and Wolf S (1978) QT Interval Prolongation as predictor of Sudden Death in Patients with Myocardial Infarction. *Circulation* 57(6): 1074-1077.
25. Ahnve S, Helmers C, Lundman T, Rehnqvist N, Sjögren A (1980) QTc Intervals in Acute Myocardial Infarction: First-Year Prognostic Implications. *Clin Cardiol* 3: 303-308.
26. Ellman GL, Courtney DK, Andres Jr V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric assay determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88-95.
27. Alves-Amaral G, Oliveira MP, Lopes ALA, Chiavegatti T, Godinho RO (2010) Gender related differences in circadian rhythm of rat plasma acetyl and butyrylcholinesterase: Effects of sex hormone withdrawal. *Chem*

Biol Interact 186: 9-15.

28. Johns TNP and Olson BJ (1954) Experimental myocardial infarction. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg* 140 (5): 675-682.
29. Goldberger JJ (1999) Sympathovagal balance: how should we measure it? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 276: H1273-H1280.
30. Breyer-Pfaff U, Maier U, Brinkmann AM, Schumm F (1985) Pyridostigmine kinetics in healthy subjects and patients with myasthenia gravis. *Int J Clin Pharmacol Ther* 37(5): 495-501.
31. Lataro RM, Silva CA, Fazan Jr R, Prado CM, Rossi MA et al. (2013) Increase in parasympathetic tone by pyridostigmine prevents the ventricular dysfunction during the onset of heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Physiol* 305 (8): R908-916.
32. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J et al. (1979) Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Cir Res* 44: 503-512.
33. Rahimtoola SH, Digillo MM, Ehsani A, Loeb HS, Rosen KM et al. (1972) Changes in left ventricular performance from early after acute myocardial infarction to the convalescent phase. *Circulation* 46: 770-779.
34. Kupper W, Bleifeld W, Hanrath P, Mathey D, Effert S (1977) Left ventricular hemodynamics and function in acute myocardial infarction: Studies during the acute phase, convalescence and late recovery. *Am J Cardiol* 40: 900-905.
35. Pontes PV, Bastos BG, Romeo Filho LJ, Mesquita ET, Nobrega AC (1999) Cholinergic stimulation with pyridostigmine, hemodynamic and echocardiographic analysis in healthy subjects. *Arq Bras Cardiol* 72: 297-306.
36. Castro RRT, Serra SM, Nóbrega ACL (2000) Reduction of QTc interval dispersion. Potential mechanism of cardiac protection of pyridostigmine bromide. *Arq Bras Cardiol* 75 (3): 210-213.

37. Nóbrega ACL, Reis AF, Moraes RS, Bastos BG, Ferlin EL et al. (2001) Enhancement of heart rate variability by cholinergic stimulation with pyridostigmine in healthy subjects. *Clin Auton Res* 11: 11-17.
38. Chaney LA, Rockhold RW, Hume AS (2002) Cardiorespiratory effects following acute exposure to pyridostigmine bromide and/or N,N-Diethyl-m-toluamide (DEET) in rats. *Int J Toxicol* 21: 287-300.
39. Soares PPS, Nóbrega ACL, Ushizima MR, Irigoyen MCC (2004) Cholinergic stimulation with pyridostigmine increases heart rate variability and baroreflex sensitivity in rats. *Auton Neurosci* 113: 24-31.
40. Kirchheim HR Systemic arterial baroreceptor reflexes. (1976) *Physiol Rev* 56: 100-176.
41. Castro RRT, Serra SM, Porfirio G, Mendes F, Oliveira LPJ et al. (2006) Pyridostigmine reduces QTc interval during recovery from maximal exercise in ischemic heart disease. *Int J Cardiol* 107(1): 138-139.
42. Zimmerman LI, Liberman A, Castro RRT, Ribeiro JP, Nóbrega ACL (2010) Acute electrophysiologic of pyridostigmine inhibition of cholinesterase in humans. *Braz J Med Biol Res* 43(2): 211-216.
43. Vanoli E, De Ferrari GM, Stramba-Badiale M, Hull Jr. SS, Foreman RD et al. (1991) Vagal stimulation and prevention of sudden death in conscious dogs with healed myocardial infarction. *Circ Res* 68: 1471-1481.
44. Brack KE, Coote JH, Andre Ng G (2011) Vagus nerve stimulation protects against ventricular fibrillation independent of muscarinic receptor activation. *J Cardiovasc Dis* 91: 437-446.
45. Ando M, Katare RG, Kakinuma Y, Zhang D, Yamasaki F et al. (2005) Efferent Vagal Nerve Stimulation Protects Heart Against Ischemia-Induced Arrhythmias by Preserving Connexin43 Protein. *Circulation* 112: 164-170.
46. Zhang Y, Kakinuma Y, Ando M, Katare RG, Yamasaki F et al. (2006) Acetylcholine Inhibits the Hypoxia-Induced Reduction of Connexin43 Protein in Rat Cardiomyocytes. *J Pharmacol Sci* 101: 214-222.

FIGURE LEGENDS

Figure legend 1. Heart subjected to coronary artery ligation. Slices (2 mm) of a representative heart after myocardial infarction, perfused retrogradely through the aorta with Evans' blue dye.

Figure legend 2. Autonomic responses after pyridostigmine (PYR). Bar graphs showing basal heart rate (thin line), intrinsic heart rate (thick line), vagal and sympathetic (SYMP) tone in anesthetized rats treated with PYR (N=18) or saline (N=16). Data are means \pm SEM. * $p < 0.05$ compared with saline.

Figure legend 3. Survival rate after myocardial infarction. Survival curves (Kaplan-Meier) of myocardial infarcted rats treated with pyridostigmine (PYR; N=14) or saline (N=14).

Figure legend 4. Hemodynamic changes after myocardial infarction. Bar graphs showing the time course (minutes) of the changes of mean arterial pressure (Δ MAP) and heart rate (Δ HR) after the acute myocardial infarction in anesthetized rats treated with pyridostigmine (PYR; N=14) or saline (N=14). * $p < 0.05$ compared with saline. Data are mean \pm SEM.

Figure legend 5. QTc interval after myocardial infarction. Bar graphs showing changes of QTc interval (Bazett) 30 and 240 minutes right after myocardial infarction (MI) in rats treated with pyridostigmine (PYR; N=10) or saline (N=11). * $p < 0.05$ compared with saline. Data are mean \pm SEM.

Figure legend 6. Arrhythmias after myocardial infarction. Representative ECG recording from anesthetized rats showing typical arrhythmias commonly observed after acute myocardial infarction. (A) isolated premature ventricular beat (PVB), (B) salvo of PVB, (C) non-sustained ventricular tachycardia and (D) period of complete atrio-ventricular block.

Figure 1:



Figure 2:

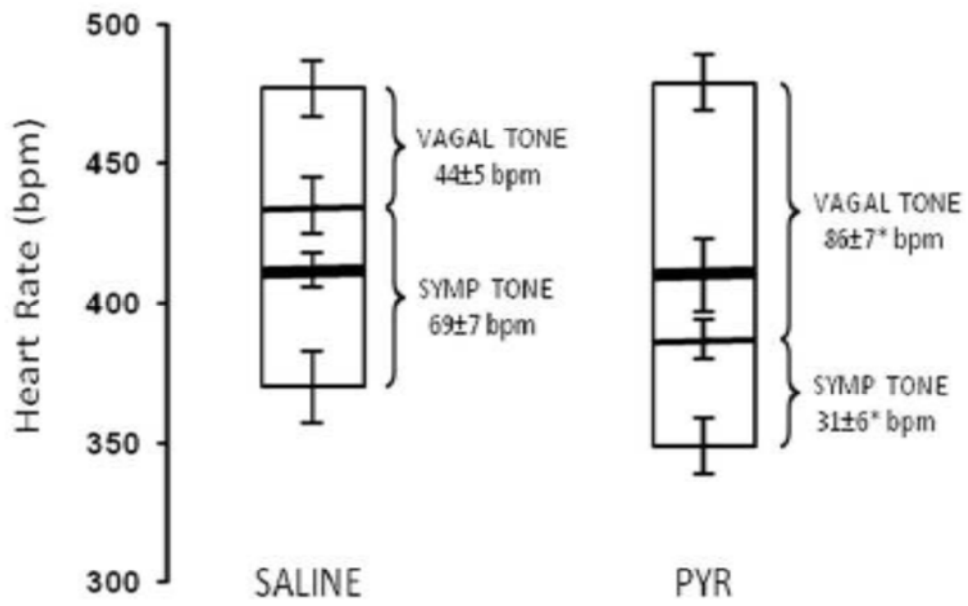


Figure 3:

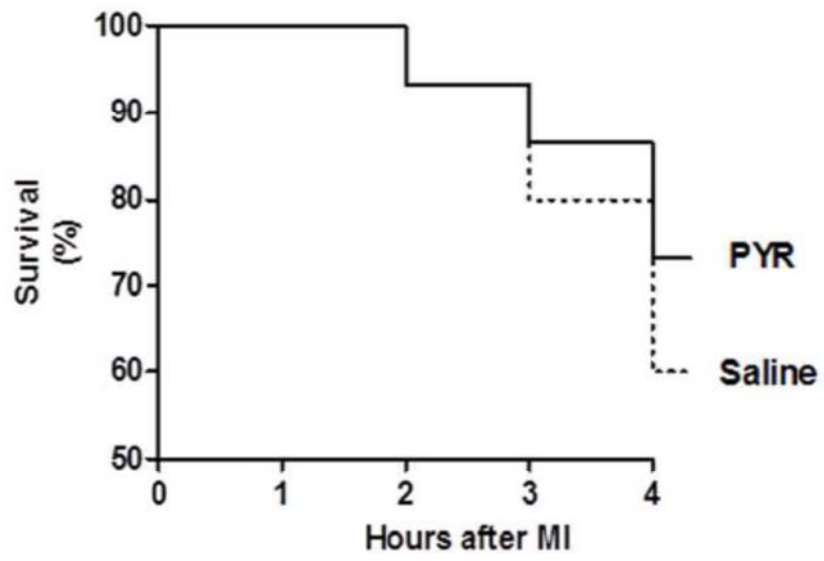


Figure 4:

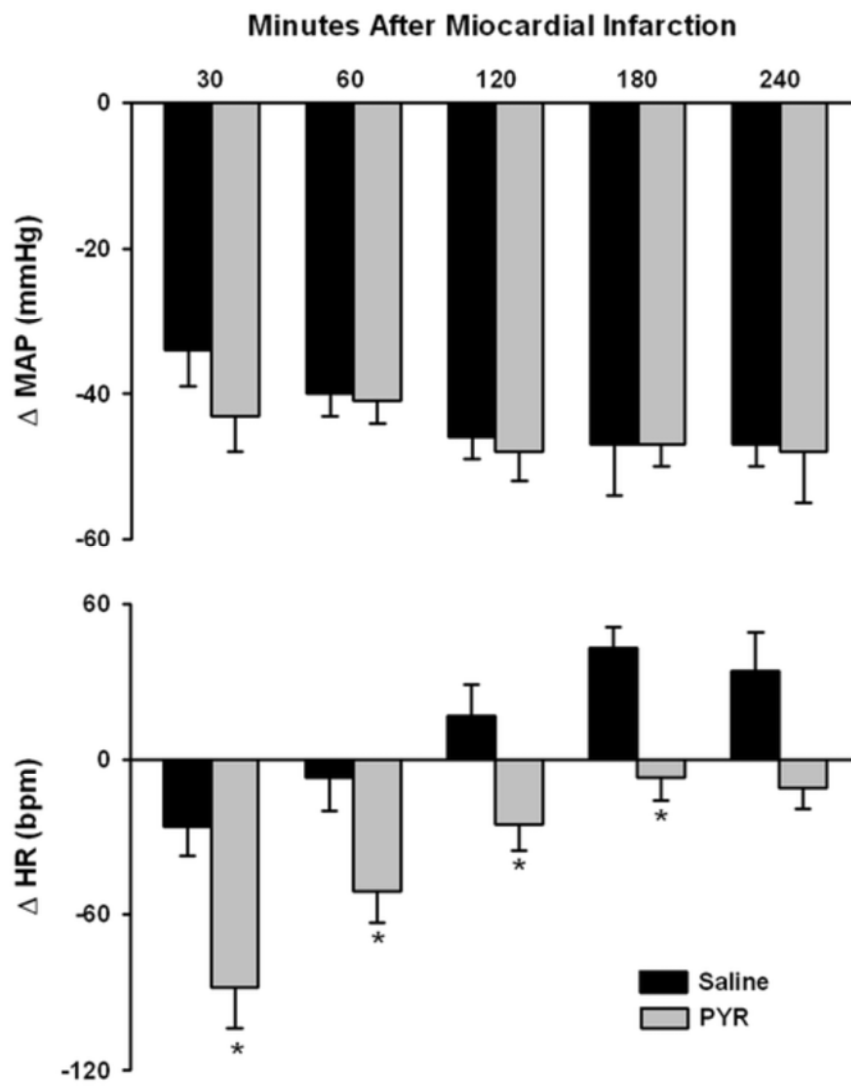


Figure 5:

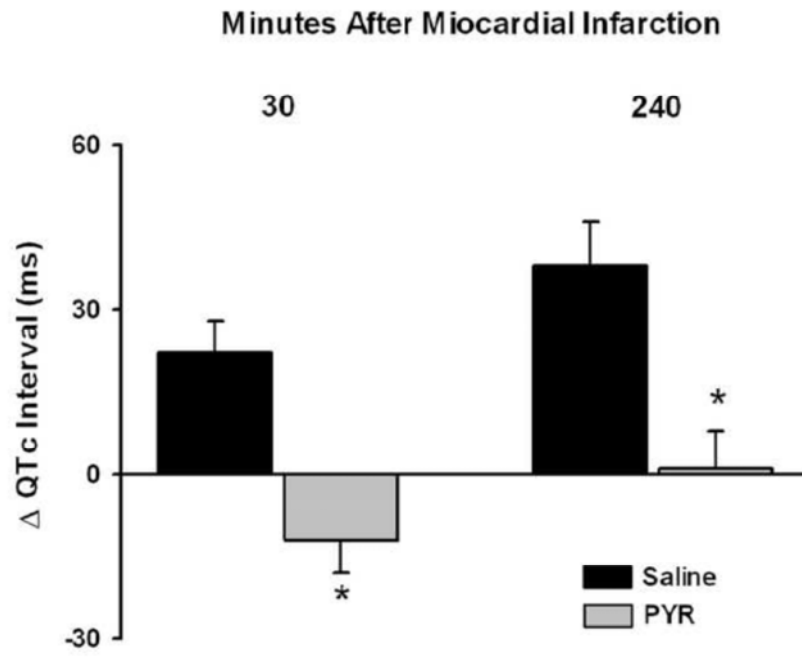
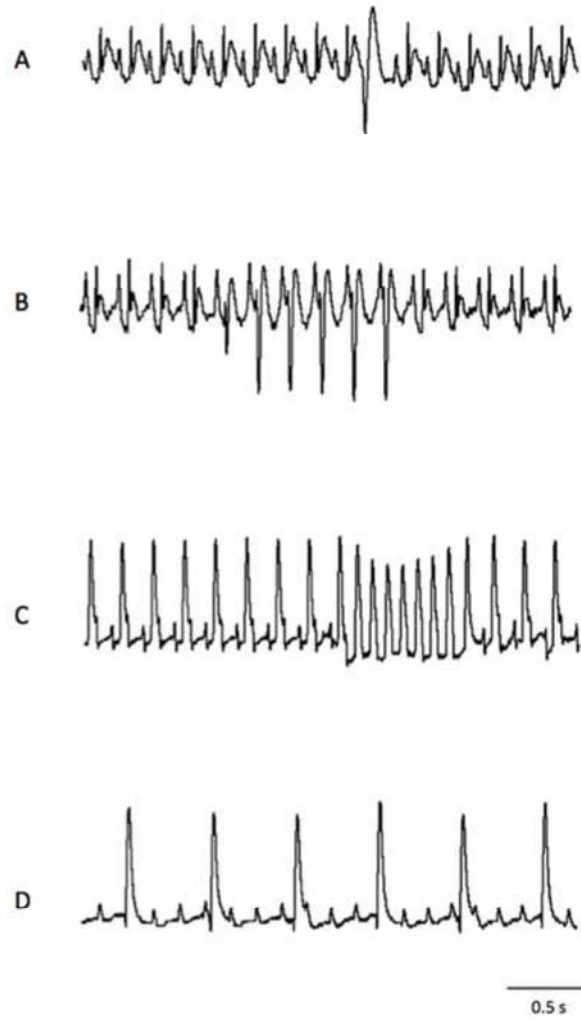


Figure 6:



*Termina e começa aqui uma nova história, uma
nova pessoa, uma nova mente.*

Fernanda Machado dos Santos