

Roberto A. Franken*
Eulogio E. Martinez**
Wilson S. Sasso***
Luiz E. S. Ferlante****
Adauto B. Lima*****

ULTRA-ESTRUTURA DA FIBRA MUSCULAR CARDÍACA DE RATOS JOVENS E SENIS SOB A AÇÃO DA NICOTINA

Os autores descrevem os aspectos ultra-estruturais de fibra muscular cardíaca em ratos submetidos à ação da nicotina. Dividem as alterações encontradas em: 1) alterações que indicam aumento do metabolismo celular: vasodilatação, edema intersticial, gotículas de pinocitose na parede do capilar e membrana celular, festonamento do sarcolema, aumento do número e tamanho das gotículas de lipídio intracelular e 2) alterações que indicam sofrimento celular: edema intracelular, desorganização das miofibrilas, faixas de contração, desorganização das cristas mitocondriais e inclusões intramitocondriais. Salientam a conservação do glicogênio intracelular, indicando não ter havido isquemia miocárdica.

O estudo da célula através da microscopia eletrônica deixou de ser mera sofisticação, tornando-se útil para a compreensão do metabolismo e fisiopatologia celular.

Após termos estudado aspectos histoquímicos da fibra muscular cardíaca sob ação da nicotina¹, interessou-nos observar as alterações ultra-estruturais nessas mesmas condições.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 10 ratos (*Rattus Norvegicus Albinus*) da colônia 2 BAW, machos, divididos em 2 grupos. O 1.º grupo era constituído por 5 animais com aproximadamente 3 meses de idade, peso variando entre 210 e 300g. O 2.º grupo era formado por 5 animais com idade entre 18 e 22 meses, pesando entre 320 e 460g. Todos os animais estavam em regime de alimentação habitual até o início do experimento.

Em cada grupo, 1 animal serviu como controle, 2 receberam 0,4 mg/kg de peso corporal de nicotina e os outros 2, 10 mg/kg de peso corporal de nicotina, respectivamente, dose de ação típica e tóxica. A droga foi administrada por via subcutânea.

Uma hora após a injeção, os animais foram sacrificados e imediatamente autopsiados. Foram retirados fragmentos de 1 mm³ da ponta do coração. O material obtido foi fixado

em glutaraldeído a 2% a 4°C em tampão fosfato a pH 7,2 e, em seguida, refixado em tetróxido de ósmio a 10%. Os cortes ultrafinos foram corados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Telas de cobre de 200 malhas foram empregadas para suporte dos cortes.

O exame dos cortes ultrafinos, bem como de suas micrografias eletrônicas, foram realizados em microscópio eletrônico de marca "Karl Zeiss" modelo EM - 952 a 60 kV.

RESULTADOS

Os resultados mostraram, para os animais do grupo-controle, aspectos ultra-estruturais semelhantes aos descritos nos trabalhos básicos de Moore e Ruska² e Stenger e Spiro³.

Cada fibra muscular cardíaca é envolvida por uma membrana denominada sarcolema, onde logo abaixo estão dispostas numerosas vesículas de pinocitose. A membrana celular se modifica nos discos intercalares, local de junção de duas fibras. O interior da célula é preenchido pelo sarcoplasma e numerosas organelas e inclusões subcelulares. Situado no centro da célula ou freqüentemente em posição excêntrica, encontra-se o núcleo, envolvido por uma dupla membrana que mostra poros. No interior do núcleo observa-se a heterocromatina disposta perifericamente, sendo que no restante do

O presente trabalho é parte da tese do doutoramento apresentado na Escola Paulista de Medicina (Disciplina de Cardiologia).

* Professor Associado Doutor, Departamento de Medicina da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

** Professor Assistente Doutor, Departamento de Medicina da Escola Paulista de Medicina.

*** Professor Titular do Departamento de Histologia do Instituto de Ciências Biológicas da USP.

**** Professor Assistente Doutor, Departamento de Medicina da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

***** Professor Pleno de Cardiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

carioplasma a cromatina se mostra dispersa como grânulos de formas e tamanho variáveis (eucromatina). Encontra-se ainda o nucléolo com componente granular semelhante à cromatina nuclear. Os elementos miofibrilares contráteis são arranjados paralelamente ao maior eixo da fibra e apresentam linhas e faixas com densidades ópticas diferentes, que dão caráter estriado à célula muscular cardíaca. Entre duas linhas Z, que se mostram como linhas de maior densidade óptica, se limita o sarcômero, que é a unidade estrutural e funcional da fibra muscular cardíaca. Em cada sarcômero vêm-se faixas claras e escuras, respectivamente faixa I e faixa A. Na faixa H está presente a linha M central. Entre as miofibrilas numerosas mitocondriais alongadas ou ovais são encontradas, envolvidas por uma dupla membrana, contendo no seu interior cristas e uma matriz granular. O retículo sarcoplasmático é uma rede de túbulos intracelular que envolve as miofibrilas e também freqüentemente observado junto ao sarcolema. Os sarcotúbulos longitudinais confluem para o túbulo transverso (túbulo T) na altura da linha Z. Encontram-se ainda no citoplasma da fibra muscular cardíaca grânulos densos, freqüentemente agrupados sob a forma de rosetas, interpretados como grânulos de glicogênio, e eventuais gotículas de lipídios geralmente próximas às mitocôndrias, de forma circular (no plano), e com diâmetros variáveis (fig. 1, 2 e 3).

No interstício são freqüentes os capilares e, ocasionalmente, observam-se fibroblastos e colágeno.

No que diz respeito aos animais nos quais foi injetado nicotina, passaremos a descrever, como resultado do exame das micrografias eletrônicas, documentadas nas figuras 4 a 10, as alterações por nós consideradas importantes.

Várias alterações foram comuns aos dois grupos de animais (jovem e senil), outras no entanto foram observadas apenas nos animais senis.

O interstício mostrou-se alargado e preenchido por um material granuloso (fig. 4). A parede capilar apresentou grande quantidade de vesículas de pinocitose distribuídas difusamente e vistas em todas as micrografias estudadas (fig.4). Os capilares estavam dilatados e eventualmente congestos. Essas alterações foram sempre mais evidentes tanto nos animais senis quanto naqueles que receberam maior dose de nicotina.

A fibra cardíaca também mostrou numerosas vesículas de pinocitose, localizadas ao longo do sarcolema (fig. 4 e 5), eventualmente com aspecto festonado (fig. 5). No sarcoplasma observamos maior número de gotículas de lipídios (fig. 4 e 5), não tendo havido, aparentemente, diminuição dos grânulos de glicogênio. O sistema tubular mostrou-se dilatado (fig. 6, 7 e 8). Em várias micrografias, encontramos edema intracelular (fig. 9). Todas essas alterações celulares foram comuns aos dois grupos de animais, sendo que nos animais senis e que receberam 10 mg/kg de peso corporal de nicotina as alterações foram mais acentuadas.

Alterações nas mitocôndrias foram observadas nos animais jovens que receberam dose maior de nicotina e em

todos os animais senis, sendo que as alterações observadas foram desde alargamento do espaço entre as cristas até a diminuição das mesmas (fig. 7 e 10), tendo sido mais freqüentemente observadas nos animais senis e que receberam dose tóxica da droga.

Apenas nos animais senis foram encontradas inclusões mitocondriais com aspecto denso e granuloso (fig. 10), bem como alterações das miofibrilas apresentadas por desorganização e faixas de contração (fig. 6, 7 e 8).

DISCUSSÃO

Os achados evidenciaram alterações da ultra-estrutura que podem ser divididas esquematicamente em dois grupos: alterações que indicam um estado metabólico aumentado e alterações que caracterizam sofrimento celular.

O alargamento do espaço pericapilar, preenchido por material granuloso, interpretado como edema intersticial, assim como o evidente aumento das vesículas de pinocitose no endotélio de praticamente todos os capilares observados, são indicativos de aumento da permeabilidade capilar além dos limites normais, assim como de aumento das necessidades metabólicas da célula. Esses achados foram também observados por Kodalenko e Sergeev⁴ ao estudar a ultra-estrutura do miocárdio de ratos submetidos a exercício até a exaustão. Ao lado desses achados, que incluímos entre aqueles do primeiro grupo, observamos festonamento da membrana celular miocárdica e grande número de vesículas de pinocitose dispostas logo abaixo do sarcolema, que interpretamos como indicativo de aumento de trocas metabólicas. Cumpre salientar aqui, de acordo com Orth e Morgan⁵, que o aumento do número de vesículas de pinocitose não é indicativo de maior transporte de glicose, uma vez que esse transporte, mesmo aumentado, não se faz com formação de vesículas. Acreditamos poder incluir ainda entre as alterações do primeiro grupo o aumento de gotículas e lipídios dentro da célula substrato morfológico de nossos achados histoquímicos.

As alterações características de sofrimento celular por nós observadas foram o edema intracelular, modificações na estrutura das mitocôndrias, inclusões intramitocondriais, desorganização das miofibrilas, faixas de contração e dilatação do sistema tubular. Entre esses achados, Tomanek e Karlsson⁶, ao descreverem a ultra-estrutura do miocárdio de ratos senis, observaram apenas desorganização das miofibrilas. Jennings e Ganote⁷ descreveram, em corações de cães submetidos a 40 minutos de isquemia seguidos de 20 minutos de reperfusão, alterações semelhantes àquelas por nós descritas para os ratos que receberam nicotina, especialmente nos animais senis. Chama-nos atenção, porém, o fato de esses autores terem descrito diminuição no número de grânulos de glicogênio, o que não ocorreu no nosso material, diante de nossos resultados histoquímicos¹, o que faz supor que não tenha havido isquemia ou que, tendo havido isquemia, as reservas de glicogênio tenham sido poupadas graças à hiperglicemia e aumento da insulina circulante induzidas pela nicotina⁸, como sugerem Syber e

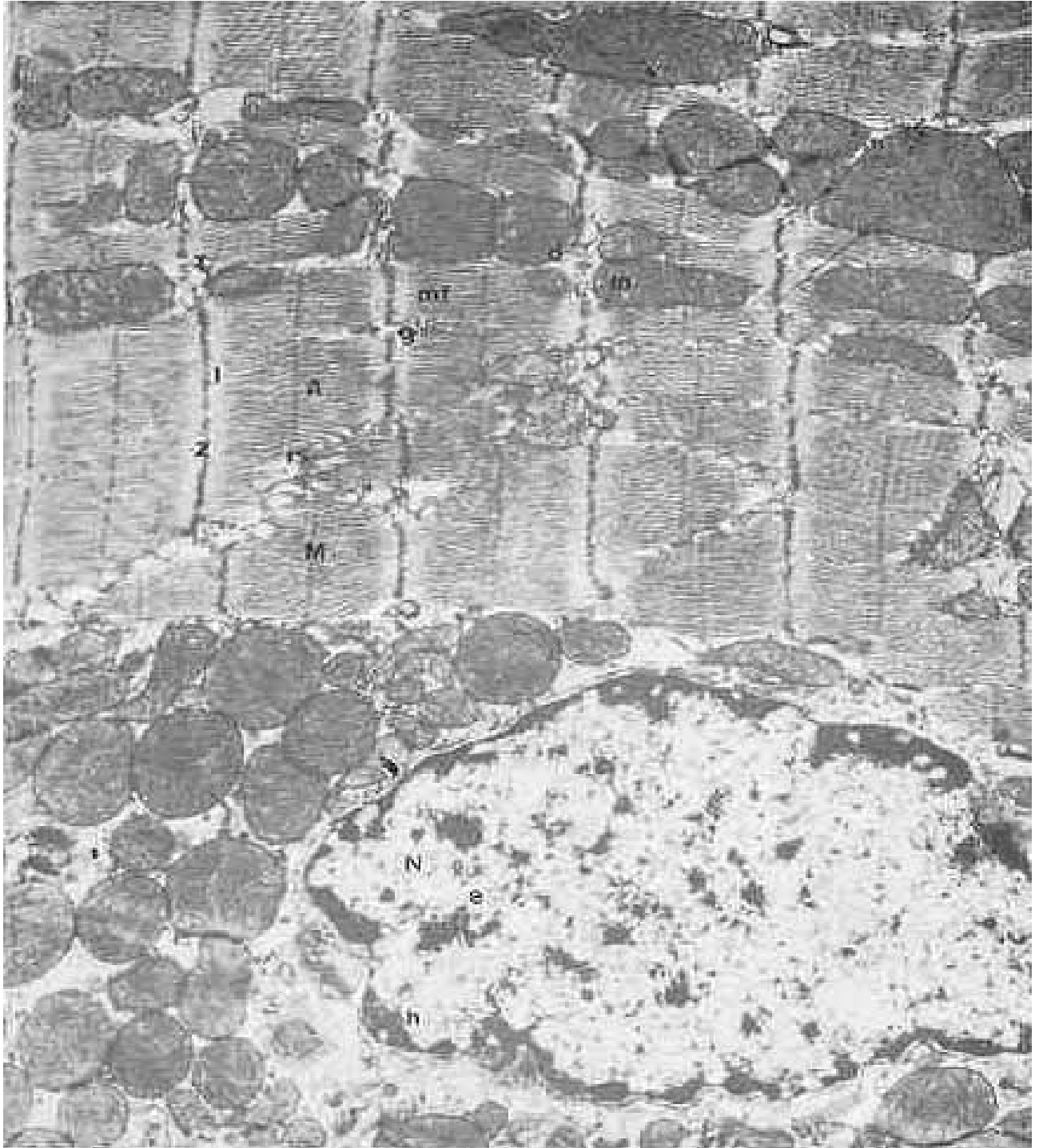


Fig.1- Micrografia eletrônica de um corte ultrafino de coração de rato jovem (controle). A foto mostra parte de uma fibra muscular cardíaca cortada longitudinalmente. Observar as seguintes estruturas: núcleo (N), com a dupla membrana apresentando poros nucleares (setas) e a cromatina sob as formas de heterocromatina (h) e eucromatina (e); mitocôndrias (m); miofibrilas com miofilamentos (mf); faixas isotrópicas (I); faixas anisotrópicas (A); faixas de Henle com as linhas M; linhas Z; retículo sarcoplasmático (rs); túbulos transversos (T); gotículas de lipídio (l); grânulos de glicogênio (g). Aumento: 17.600X.

col. ⁹, quando usam glicose, insulina e potássio na proteção do miocárdio isquêmico. Deve-se salientar que Ahmed e col.10 descreveram, em cães sob ação da nicotina a longo prazo, aumento no número de grânulos de glicogênio e no colágeno intersticial.

Os achados da faixa de concentração, bem como inclusões nas mitocôndrias, já foram descritos em ratos, após 8 minutos da injeção intraperitoneal de isoproterenol¹¹, sem que tenha sido concluído pelos autores ter havido anoxia miocárdica. Podemos, pois, supor que a nicotina,

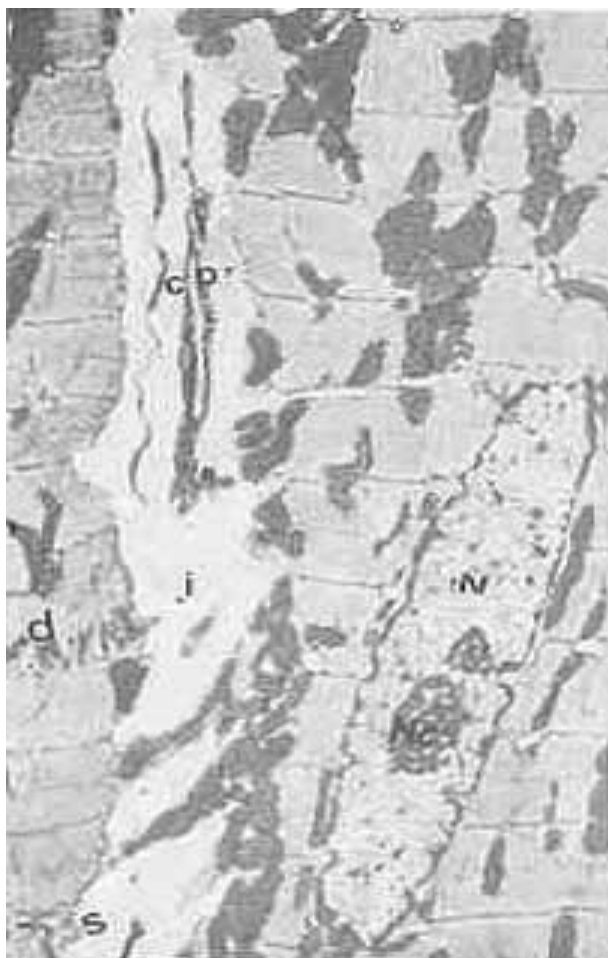


Fig.2- Micrografia eletrônica de um corte ultrafino de coração de rato senil (controle), mostrando porções de duas fibras do miocárdio cortadas longitudinalmente. Na fibra da direita pode ser visto o núcleo (N) com nucléolo (Nc). Ainda podem ser observadas as seguintes estruturas: sarcolema (s); disco intercalar (d); intertísco (i); capilares com vesículas de pinocitose (cp). Aumento: 6.040X.

através de sua ação sobre o sistema nervoso simpático, tenha ações semelhantes à do isoproterenol. A comprovação desses fatos foi feita através do uso de drogas bloqueadoras adrenérgicas precedendo o uso de nicotina¹². As faixas de contração representam sarcômeros contraídos¹³ e estariam relacionados com a queda na concentração do ATP intracelular¹⁴. A mitocôndria, alterada em sua estrutura, não supriria a célula em suas necessidades energéticas, devido ao bloqueio da cadeia respiratória. O depósito de material eletrodense com aspecto granular na mitocôndria se deve à deposição de fosfato de cálcio por maior captação do íon cálcio. Shen e Jennings¹⁵ descreveram esses depósitos na mitocôndrias da fibra muscular cardíaca submetida à isquemia transitória, tendo ainda observado maior concentração no cálcio intracelular. Jennings e Ganote⁷, na discussão de seu trabalho, referem poder haver acúmulo de cálcio intracelular após dose tóxica de catecolaminas. O acúmulo do cálcio se deve provavelmente a alterações no sistema sarcotubular, responsável pela captação do cálcio no relaxamento muscular, e que se mostrou dilatado em nossos animais submetidos à nicotina. Essas alterações na distribuição do cálcio provocada pela nicotina já haviam sido sugeridas por Nayler¹⁶.

O edema da fibra muscular cardíaca se deve a alterações na permeabilidade da membrana como acúmulo de sódio e água no meio intracelular. Finalmente, as alterações da estrutura das mitocôndrias que observamos foram desde edema com dissociação das cristas até perda das mesmas, sendo substituídas por material amorfo, fato esse classicamente considerado em corações submetidos a isquemia como indicativo da irreversibilidade das lesões.

SUMMARY

The effects of nicotine on cardiac ultrastructure were evaluated by studying the histochemical aspects of the rat cardiac muscle cell, after receiving sub-cutaneous nicotine. The alterations were divided in two groups:

1. Ultrastructural changes indicative of increased cellular metabolism: vasodilatation, pericapillary edema, increased number of pinocytotic vesicles at the capillary wall and sarcolema, cytoplasmatic projections of the myocardial cell and increased number and size of intracellular lipid droplets.

2. Ultrastructural changes indicative of cellular damage: intracellular edema, myofibril disorganization, contraction bands, swollen mitochondria, intramitochondrial granules. It is stressed that the glycogen particles were not reduced in number, indicating that the process is not ischemic.

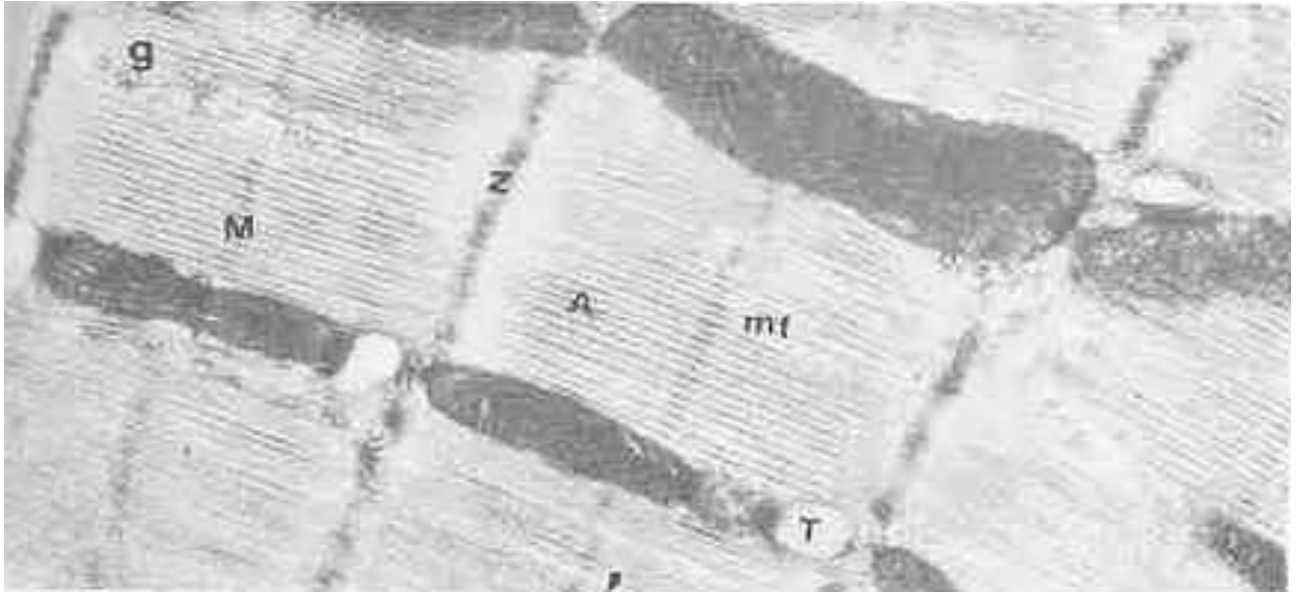


Fig.3- Micrografia eletrônica de um corte ultrafino de coração de rato senil (controle). Observar as seguintes estruturas: retículo sarcoplasmático (rs); sistema tubular (T); miofibrilas com miofilamentos (mf) faixa I; faixa A; faixa H com a linha M; linha Z; mitocôndrias (m). Aumento: 35.200X.

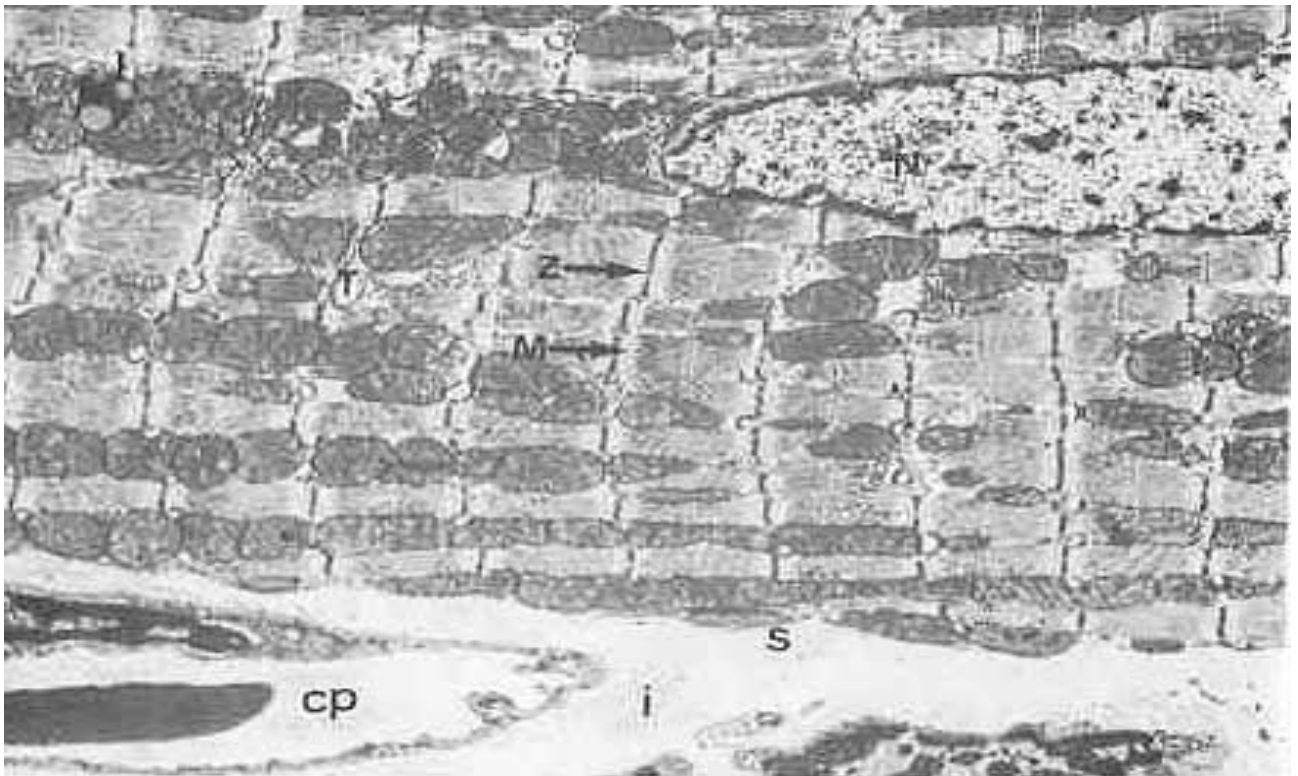


Fig. 4- Micrografia eletrônica de um corte ultrafino de coração de rato jovem que recebeu 10 mg/kg de peso corporal de nicotina. A foto mostra porções de duas fibras cardíacas, sendo que na fibra inferior são observadas numerosas gotículas de lipídios (l); núcleo (N); linha Z ocupando o centro da faixa I; linha M; ocupando a faixa H, no centro de faixa A; sistema tubular (T); sarcolema (s); Interstício (i); capilar com vesículas de pinocitose (c). Aumento: 6.040X.



Fig. 5- Micrografia de um corte ultrafino de coração de rato jovem que recebeu 10 mg/kg de peso corporal de nicotina. A foto mostra porções de duas fibras musculares cardíacas onde podem ser observadas: sarcolema (s), inclusive acompanhando aspecto festonado da superfície da fibra inferior; mitocôndrias (m); sistema tubular (T); gotículas de lipídios (l); intertísco (i). Aumento: 26.400X.

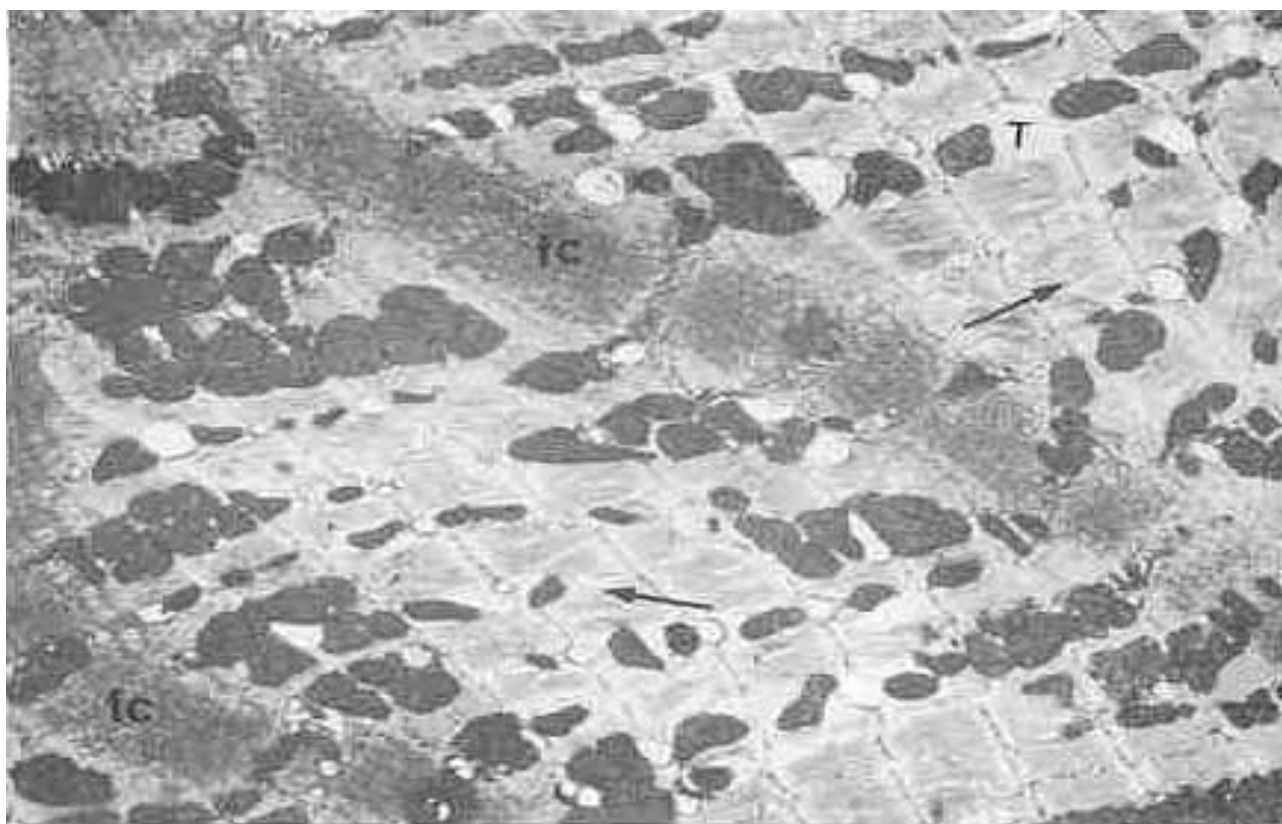


Fig. 6- Micrografia eletrônica de um corte ultrafino de coração de rato jovem que recebeu 0,4 mg/kg do seu peso corporal de nicotina. A foto mostra desorganização das miofibrilas (setas); faixas de concentração (fc) dispostas transversalmente na fibra; sistema tubular dilatado (T). Aumento: 6.040X.

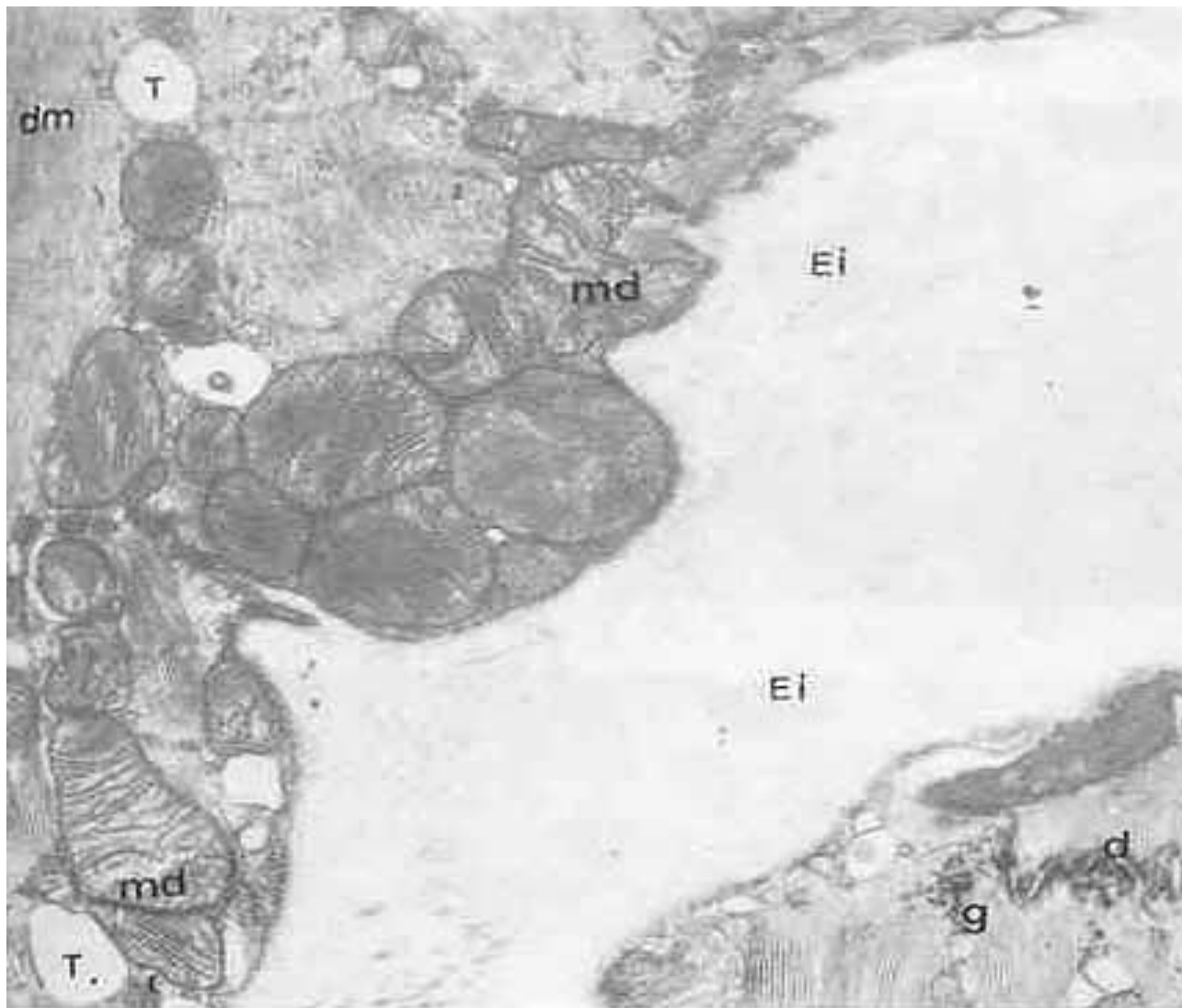


Fig. 7- Micrografia eletrônica de um corte ultrafino de coração de rato jovem que recebeu 10 mg/kg do seu peso de nicotina. A foto mostra porções de duas fibras musculares cardíacas. Observar desorganização dos miofilamentos (dm); mitocôndrias com diminuição do número de cristais e alargamento dos espaços entre elas (md). Entre as fibras edema intersticial (Ei). Ainda podem ser observadas as seguintes estruturas: sarcolema (s); sistema tubular (T); grânulos de glicogênio (g); disco intercalar (d). Aumento: 17.600X.



Fig. 8- Micrografia eletrônica de um corte ultrafino de coração de rato senil que recebeu 0,4 mg/kg do seu peso corporal de nicotina. A foto mostra em maior aumento uma região da figura 6. Observar desorganização dos miofilamentos (dm); faixa de concentração (fc); sistema tubular dilatado (T). Aumento: 17.600X

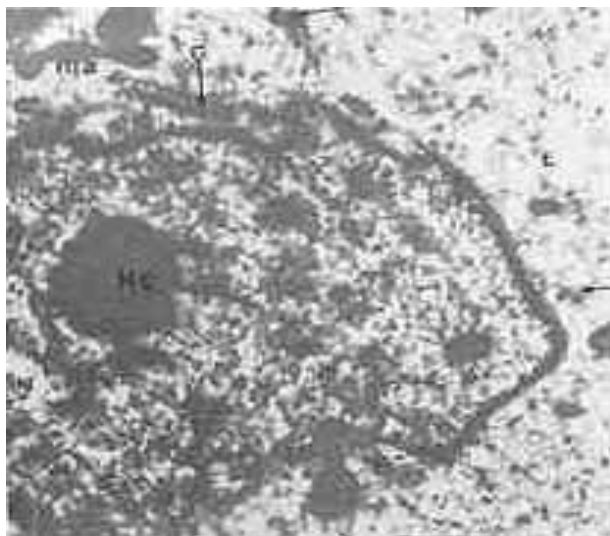


Fig. 9- Micrografia eletrônica de um corte ultrafino de coração de rato senil que recebeu 10 mg/kg do seu peso corporal de nicotina. A foto mostra extenso edema perinuclear (E); núcleo (Nc); mitocôndrias alteradas (ma); grânulos de glicogênio (setas); complexo de Golgi (G). Aumento: 17.600X.

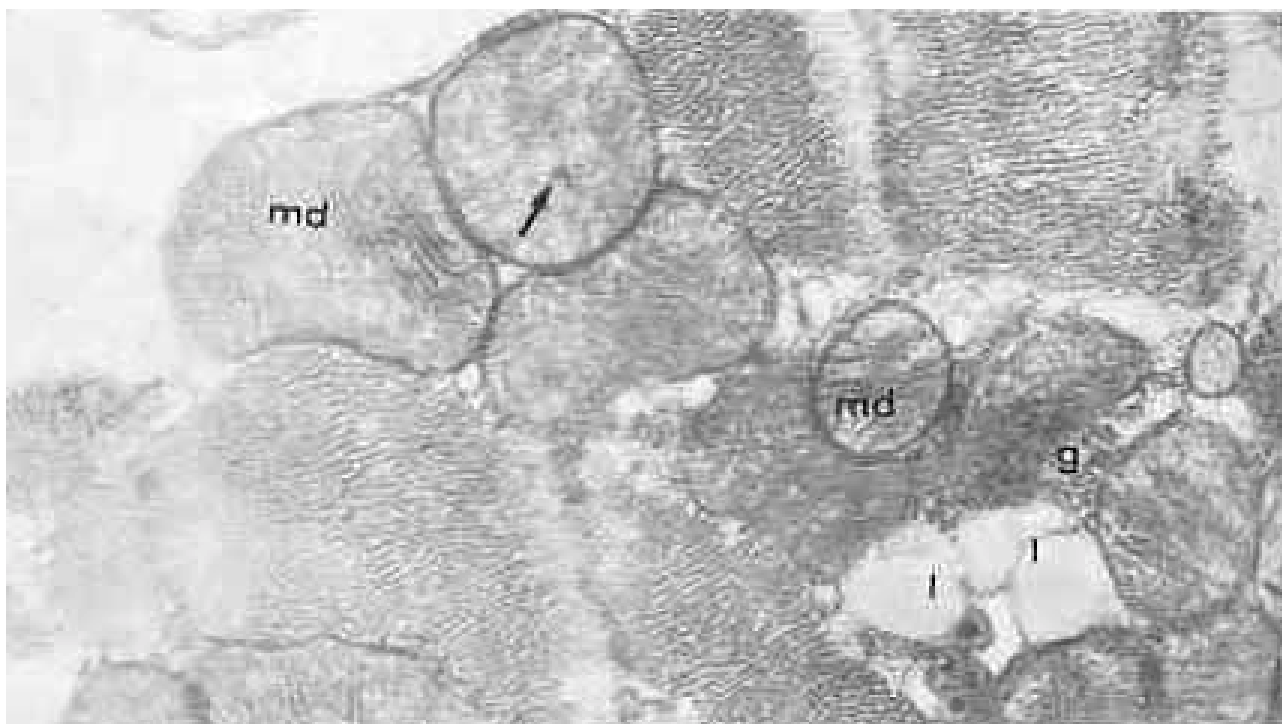


Fig. 10- Micrografia eletrônica de um corte ultrafino de um rato senil que recebeu 10 mg/kg do seu peso corporal de nicotina. A foto mostra porção de fibra muscular cardíaca onde se observam mitocôndrias com inclusões (setas); mitocôndrias com diminuição do número de cristais e alargamento dos espaços entre as mesmas (md). Ainda podem ser observadas: gotículas de lipídios (l); grânulos de glicogênio (g). Aumento: 35.200X.

REFERÊNCIAS

1. Frankon, R. A.; Martinez, E. E.; Sasso, W. B.; Lima, A. B. - Aspectos histoquímicos da fibra muscular cardíaca de ratos jovens e senis sob a influência da nicotina. *Arq. Bras. Cardiol.* 34:289, 1980.
2. Moore, D. N.; Ruska, H. - Electron microscope study of mammalian cardiac muscle cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3: 261, 1957.
3. Stenger, R. J.; Spiro, D. - The ultrastructure of mammalian cardiac muscle. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9: 325, 1961.
4. Kodalenko, V. F.; Sergeev, Y. P. - Changes in the capillary ultrastructure of the rat myocardium following nonrepetitive physical exertion. *Bull. exp. Biol. Med.* 78: 1427, 1975.
5. Orth, D. N.; Morgan, H. R. - The effect of insulin, alloxan diabetes, and anoxia on the ultrastructure of the rat heart. *J. Cell Biol.* 15: 509, 1962.
6. Tomaneck, R. J.; Karlsson, U. L. - Myocardial ultrastructure of young and senescent rats. *J. Ultrastruc. Res.* 42: 201, 1973.
7. Jennings, R. B.; Ganote, C. E. - Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ. Res.* 34/35 (Suppl.) 22: 866, 1963.
8. Sandberg, H.; Roman, L.; Zavodnick, J.; Kupers, M. - The effect of smoking on serum somatotropin, immunoreactive insulin and blood glucose levels of young adult males. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 184: 787, 1973.
9. Syber, H. D.; Maroko, P. R.; Ashraf, M.; Libby, P.; Braunwald, E. - The effect of glucose - insulin - potassium on cardiac ultrastructure following acute ex-

- perimental coronary occlusion. *Am. J. Path.* 70: 401, 1973.
10. Ahmed, S. S.; Moschos, C. B.; Lyons, M. M.; Oldewurtel, H. A.; Coumbs, R. J.; Regan, T. J.. - Cardiovascular effect of long term cigaret smoking and nicotine administration. *Am. J. Cardiol.* 37: 33, 1976.
 11. Bloon, S.; Cancilla, P. A. - Myocytolysis and mitochondrial calcification in rats myocardium after low doses of isoproterenol. *Am. J. Path.* 54: 373, 1969.
 12. Ferlante, L. E. S. - Efeito do propranolol sobre o miocárdio de ratos albinos submetidos à ação da nicotina. Estudo ultra-estrutural. Tese, Escola Paulista de Medicina, 1979.
 13. Herdson, P. B.; Sommers, H. M.; Jennings, R. B. - A comparative study of the fine structure of normal and ischemia dog myocardium with special reference to early changes following temporary occlusion of a coronary artery. *Am. J. Pathol.* 46: 367, 1965.
 14. Hearse, D. L.; Garlick, P. B.; Humphrey, S. M. - Ischemic contracture of the myocardium mechanism and prevention. *Am. J. Cardiol.* 39: 986, 1977.
 15. Shen, A. C.; Jennings, R. B. - Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. *Am. J. Pathol.* 67: 417, 1972.