

Antonio Carlos Lopes \*  
Luiz Longhi \*\*  
Luiz Octávio de Medeiros \*\*  
Duílio Ramos Sustovich \*\*\*  
Wilson da Silva Sasso \*\*\*\*

## ATIVIDADE DE ALGUMAS ENZIMAS DO MÚSCULO CARDÍACO DO RATO ALBINO DURANTE O ESTRESSE AGUDO. ESTUDO HISTOQUÍMICO

*Foram estudadas as alterações histoquímicas relativas ao grau de positividade da desidrogenase succínica, da desidrogenase láctica, da adenosina trifosfatase e da aldolase da fibra cardíaca do rato albino em estresse agudo.*

*Os resultados obtidos indicam que, durante o estresse agudo, há maior demanda metabólica da fibra cardíaca, com aumento do metabolismo oxidativo aeróbico, não ocorrendo hipoxia.*

O músculo cardíaco, em condições normais, obtém sua energia quase exclusivamente do metabolismo oxidativo. Diversos substratos são utilizados como fonte de energia sendo o principal representado pelos ácidos graxos livres. Glicose e lactato são utilizados praticamente em igual proporção enquanto piruvato, corpos cetônicos e aminoácidos, em pequena quantidade<sup>1,2</sup>.

Nos processos metabólicos várias enzimas estão envolvidas e é nosso objetivo neste trabalho estudar, na fibra cardíaca do rato albino, o comportamento, do ponto de vista histoquímico, de algumas dessas enzimas das vias metabólicas aeróbica e anaeróbica representativas das alterações metabólicas que surgem na fibra cardíaca frente ao estresse agudo provocado, pelo formol<sup>3</sup>.

### MATERIAL E MÉTODOS

De 6 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), pertencentes ao mesmo grupo etário, machos, adultos, pesando 200 a 220 g, em regime de alimentação normal (ração utilizada no biotério central da Escola Paulista de Medicina) e com água "ad libitum", 3 foram utilizados para o "grupo controle" e 3 submetidos, isolada e consecutivamente, a estresse agudo, com a finalidade de que o experimento fosse repetido três vezes, o que é importante (do ponto de vista biológico) para efeito de comparação da reprodutibilidade dos resultados obtidos.

Os ratos pertencentes ao grupo experimental receberam, cada um, duas injeções subcutâneas de 0,5

ml de formol a 10%: com intervalo de 12 horas, ou seja, um total de duas doses por animal<sup>4</sup>. A fim de manter condições basais equivalentes, os ratos de ambos os grupos foram mantidos em gaiolas individuais, em jejum e sem água, durante 22 h, após as quais foram sacrificados.

Um animal de cada grupo era sacrificado por traumatismo craniano, retirando-se de cada animal, o mais rapidamente possível, o coração, que foi dividido em duas metades congeladas a -30°C<sup>5</sup>.

Com a finalidade de se detectar o estado de estresse agudo<sup>6</sup>, retirou-se a supra-renal dos animais para detecção de lipídios<sup>7</sup> e o fígado para detecção de glicogênio<sup>8</sup>.

Os cortes forneceram material para a detecção histoquímica das seguintes enzimas: adenosina, trifosfatase (ATPase); desidrogenase succínica (SDH); aldolase; desidrogenase láctica (LDH); fosforilase ativa, segundo técnicas descritas por Wegmann<sup>5</sup>.

As reações para evidenciação da atividade das enzimas estudadas foram controladas pela retirada dos substratos específicos dos diferentes meios de incubação, apenas num dos três experimentos realizados. Assim procedemos, porque as técnicas por nós utilizadas têm sido exaustivamente comprovadas<sup>5</sup>.

### RESULTADOS

Os resultados obtidos estão contidos na tabela I.

Trabalho realizado na Disciplina de Histologia do Departamento de Morfologia da Escola Paulista de Medicina.

\* Professor-Adjunto do Departamento de Medicina da Escola Paulista de Medicina.

\*\* Professor-Adjunto do Departamento de Histologia da Universidade de São Paulo.

\*\*\* Professor-Titular do Departamento de Medicina da Escola Paulista de Medicina.

\*\*\*\* Professor-Titular da Disciplina de Histologia do Departamento de Morfologia da Escola Paulista de Medicina

**Tabela I - Resultados da detecção histoquímica da atividade de enzimas em fibra cardíaca dos ratos albinos do “grupo controle” e em estresse agudo.**

Enzimas	1.º experimento		2.º experimento		3.º experimento	
	controle	estresse	controle	estresse	controle	estresse
SDH	1+	3+	1+	3+	1+	3+
ATPase	1+	3+	1+	3+	1+	3+
Fosforilase	1+	1+	1+	1+	1+	1+
LDH	1+	1+	1+	1+	1+	1+
Aldolase	1+	3+	1+	2+	1+	3+

1+ = positividade fraca; 2+ = positividade moderada; 3+ = positividade intensa.

## DISCUSSÃO

No presente trabalho escolhemos, fundamentados em Marcondes de Almeida<sup>4</sup> e Selye<sup>3</sup>, como agente alarmógeno, o formol. Realmente, dentre os vários alarmógenos, acreditamos ser o formol o único desencadeador do estresse agudo que, nas condições do nosso experimento, não levaria o animal a um estado de hipoxia que pudesse interferir nos resultados.

No momento do sacrifício, os animais submetidos à ação do formol encontravam-se realmente em estresse agudo, fato esse testemunhado não apenas pela observação dos mesmos, mas principalmente pela diminuição acentuada de lipídios nas glândulas supra-renais; e pela ausência quase total do glicogênio hepático.

Podemos afirmar que todos os organismos e mesmo os diferentes tecidos e órgãos de um mesmo organismo apresentam constituição química de base e processos metabólicos comuns. A caracterização funcional desses diferentes níveis de organização, certamente, é acompanhada por adaptações secundárias e específicas.

Assumem caráter universal a via glicolítica, a via das pentoses e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos.

O coração é dotado dessas vias metabólicas nos mesmos moldes que os demais órgãos, ficando as diferenças específicas à mercê de fenômenos regulatórios particulares.

Sendo um órgão continuamente ativo, embora de maneira cíclica, tem metabolismo quase exclusivamente aeróbico no indivíduo em repouso ou em atividade. Tal condição torna-o pobre em enzimas anaeróbicas e extremamente rico em aeróbicas, conforme pode ser comprovado pelos elevados níveis de citocromos.

Em decorrência do exposto, é plenamente justificável que a fibra cardíaca seja rica em mitocôndrias e que a beta-oxidação dos ácidos graxos seja extremamente operativa, uma vez que esses representam fonte bioenergética de primeira linha.

Entretanto, o coração não é, de maneira alguma, um simples metabolizador final de ácidos graxos livres podendo, mesmo em condições fisiológicas, armazená-los sob a forma de triglicerídeos. Dessa forma, ainda que ao animal custe caro a sua capacidade de armazenar energia sob forma de gordura, é óbvia a importância da conservação de um excesso de calorías, para as necessidades futuras. Nesse sentido, é importante lembrar que a esterificação dos ácidos graxos é promovida pelo metabolismo de carboidratos,

ficando assim, o fluxo glicolítico comprometido na biossíntese de glicerol.

Para a via glicolítica de Embden-Meyerhof, elegemos a detecção da atividade aldolásica, por ter essa proteína catalítica, como produtos finais, as trioses. Também a desidrogenase láctica foi eleita para essa via pois, além de estar envolvida no metabolismo anaeróbico, é de real importância na manutenção dos níveis de NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada) citoplástico, bem como para a capacidade de consumo de ácido láctico.

Não seria mister justificar neste estudo a presença da desidrogenase succínica, visto ser essa enzima apanágio de mitocôndrias e o metabolismo oxidativo aeróbico de um tecido ser razão direta da população mitocondrial.

Por sua vez, a atividade ATPásica foi eleita porque seus resultados poderiam informar condições de maior ou menor trabalho cardíaco durante o estresse agudo.

Os resultados obtidos para a reação aldolásica sugerem que a velocidade do fluxo glicolítico esteja razoavelmente elevada nos animais submetidos ao estresse agudo. Esse achado viria em apoio ao fato de que o aumento de lipídios impõe também maior utilização de glicose<sup>9</sup>.

Corroborando, ainda, a sugestão de maior consumo de glicose a observação de que a atividade ATPásica se mostrou mais positiva na fibra cardíaca do rato em, estresse agudo, sendo justo supor que essa se encontre em maior trabalho, quer no tocante à contração, quer às trocas iônicas, uma vez que, em altos níveis de trabalho cardíaco, a glicose pode contribuir com mais de 80% do total, do oxigênio consumido.

Admitindo, portanto, que o estado de estresse agudo, produzido pelo formol, induziria carga adicional de trabalho cardíaco mecânico e iônico, uma vez que a atividade ATPásica se mostrou mais positiva na fibra cardíaca dos ratos submetidos à ação do alarmógeno, a contribuição da glicose procedente do sangue poderia ser bastante relevante. Deve ser lembrado também que o consumo de oxigênio aumenta substancialmente durante os períodos de maior solicitação cardíaca. Com efeito, esse evento parece ter ocorrido em nosso estudo, pois é muito sugestiva a análise do comportamento da reação da desidrogenase succínica. Sua maior atividade nas fibras cardíacas dos ratos em estresse agudo caracteriza o metabolismo aeróbico mais pronunciado do que nos animais do “grupo controle”.

Em vista disso, o ciclo dos ácidos tricarboxílicos necessita estar ativado por conta da indução do alarmógeno, fenômeno que justificaria nossos resultados em relação à desidroge-

nase succínica. Essa condição de maior aerobiose, está claro, se daria por parte de maior aporte de grupos acetila e é justo admitirmos que esses sejam oriundos principalmente da beta oxidação dos ácidos graxos. Esses eventos sugerem que há um trabalho adicional do miocárdio com maior rendimento de ATP, porém fica realmente curioso o fato de que o órgão, além desse trabalho, promova ainda maior armazenamento de lipídios do que nos animais do “grupo controle”.

Tal armazenamento adicional deve ser de significado bastante relevante, pois envolve verdadeiro gasto para a economia do órgão. Dessa forma, necessariamente teria a fibra cardíaca, durante o estresse agudo produzido pelo formol, que consumir mais glicose do que o normal, a fim de fornecer compostos glicolíticos intermediários tão indispensáveis para a esterificação dos ácidos graxos a serem armazenados.

Por outro lado, esse maior consumo também se justificaria em razão de que a aerobiose adicional realizada por beta-oxidação liberaria quantidades anormais de NADH e a sua oxidação ativaria o sistema conhecido como “lançadeira” do glicerol. As quantidades anormais de glicerol seriam, portanto, mais uma razão pela qual acreditamos que deva estar ocorrendo maior consumo de glicose durante o estresse agudo.

Em suma, parece justo acreditarmos que a atividade aldolásica está aumentada para atender a duas finalidades: a 1.<sup>a</sup> seria lipídogenica, já que as trioses formadas forneceriam glicerol e, a 2.<sup>a</sup>, bioenergética, uma vez que a reoxidação de NADH poderia estar sendo ativada no citosol.

Em resumo, podemos dizer que o músculo cardíaco, quando submetido ao estresse agudo causado pelo formol,

é induzido a desenvolver carga adicional de trabalho, o que determina ajustes metabólicos, comprovados pelo aumento da atividade ATPásica e pela ativação das condições de aerobiose, manifestação pela maior atividade da desidrogenase succínica da fibra cardíaca.

#### SUMMARY

Histochemical alterations in SDH, LDH ATPase and aldolase pattern of rate myocardium during acute stress were studied.

The results obtained indicate increase of aerobic oxidative metabolism with absence of hypoxia.

#### REFERÊNCIAS

1. Ballard, F. B.; Danforth, W. H.; Neagle, S.; Bing, R. J. - Myocardial metabolism of fatty acids. *J. Clin. Invest.* 39: 717, 1960.
2. Bing, R. J. - Myocardial metabolism. *Circulation*, 12: 635, 1955.
3. Selye, H. - A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature (Lond.)*, 138: 32, 1936.
4. Marcondes de Almeida, P. A. - Ação do frio, do formol e da hipoxia sobre o glicogênio e os lipídeos da placenta de ratas prenhas (*Rattus nervegicus albinus*, Rodentia, Mammalia) São Paulo, 1968 (Tese, Escola Paulista de Medicina).
5. Wegmann, R. - Techniques histoenzymologiques. *Institut d'histochimie médicale. Faculté de Médecine, Paris*, 1967.
6. Selye, H. - Studies on adaptation. *Endocrinology*, 21: 169, 1937.
7. Lison, L. - Sur de nouveaux colorants histologiques spécifiques de lipides. *C. R. Soc. Biol., Paris*, 115: 202, 1934.
8. McManus, J. F. A. - Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature, (Lond.)*, 158: 202, 1946.
9. Scheuer, J.; Penpargkul, S. - Myocardial metabolism. In: Willerson, J. T.; Sanders, C. A. ed. - *Clinical Cardiology*. Grune & Stratton. N. York, 1977, p. 47.