

ESTUDO HISTOQUÍMICO DO GLICOGÊNIO E LIPÍDIOS NO MÚSCULO CARDÍACO DO RATO ALBINO DURANTE O ESTRESSE AGUDO

ANTONIO CARLOS LOPES *, LUIZ LONGHI ***, LUIZ OCTÁVIO DE MEDEIROS **, DUÍLIO RAMOS SUSTOVICH ***, WILSON DA SILVA SASSO ****

Foi realizado o estudo histoquímico do glicogênio e lipídios no coração do rato albino em estresse agudo provocado pelo formol. Foram utilizados 12 animais, 6 constituíram o “grupo-controle” e 6, submetidos ao estresse agudo, o “grupo-experimental”.

O glicogênio foi estudado pela técnica do PAS com controle pela amilase salivar. O grau de positividade dessa substância foi o mesmo em ambos os grupos. Os lípidos em geral foram estudados pela técnica do “sudan black B”.

Importante aumento do grau de positividade dessa substância foi encontrado na fibra muscular cardíaca dos ratos em estresse agudo. A técnica do sulfato de azul do Nilo mostrou, nesses lipídios, predominância de radicais ácidos.

O interesse pelo estudo do metabolismo da fibra cardíaca aumentou nos últimos 20 anos, a fim de atender às necessidades de melhor conhecimento da fisiologia e patologia do coração¹⁻⁸.

O músculo cardíaco normal obtém sua energia quase exclusivamente do metabolismo oxidativo. Ao contrário do músculo esquelético, em que grande parte da atividade é garantida pela degradação do glicogênio e formação de ácido láctico, o miocárdio apresenta características metabólicas próprias⁹.

A fibra muscular cardíaca utiliza diversos substratos como fonte de energia, sendo que a principal é representada pelos ácidos graxos livres¹⁰. Glicose e lactato são utilizados, praticamente, em igual proporção e piruvato, corpos cetônicos e aminoácidos em pequena quantidade¹. Segundo Opie⁵, a função do glicogênio ainda não está estabelecida. Somente em condições extremas, tal como anoxia, o glicogênio cardíaco é mobilizado, persistindo, até o momento, a conclusão de Evans¹¹: é “reservado para emergências na anoxia”.

A importância dos ácidos graxos no metabolismo do miocárdio está bem estabelecida. Em condições fisiológicas, são oxidados preferentemente aos hidratos de carbono e esta oxidação normalmente contribui com 60-70% do metabolismo oxidativo mio-

cárdio, sendo que, em certas condições, pode contribuir 100% para a fosforilação oxidativa^{2,5}.

Nos corações perfundidos com glicose como único substrato exógeno, a oxidação dessa substância pode contribuir, em baixo nível de trabalho cardíaco, com aproximadamente 40% do consumo de oxigênio, sugerindo que os lipídios endógenos também são consumidos preferentemente aos hidratos de carbono. Em altos níveis de trabalho cardíaco, a oxidação da glicose pode, contudo, contribuir com mais de 80% do total de oxigênio consumido⁸.

Com base nesses conhecimentos, é nosso objetivo no presente trabalho estudar, histoquimicamente, o comportamento do glicogênio e dos lipídios em geral, na fibra cardíaca do rato albino em estresse agudo produzido pelo formol.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos, para a presente pesquisa, 12 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da colônia 2 BAWL¹², pertencentes ao mesmo grupo etário, machos, adultos, pesando entre 200 e 220 g, que estavam em regime de alimentação normal (ração utilizada no Biotério Central da Escola Paulista de Medicina) e com

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

* Professor Adjunto do Departamento de Medicina da EPM.

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

*** Professor Titular da Disciplina de Medicina da EPM.

**** Professor Titular da Disciplina de Histologia do Departamento de Morfologia da EPM.

água “ad libitum”. Seis animais constituíram o “grupo-controle” e 6, o “grupo-experimento”.

Os ratos pertencentes ao grupo experimental receberam, cada um, duas injeções subcutâneas de 0,5 ml de formol a 10%, a 1.^a a dose a zero hora do experimento e a 2.^a, exatamente na 12.^a hora, ou seja, um total de duas doses por animal ¹³. 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.

Em virtude de a experiência ter sido repetida três vezes, cada dupla de ratos (um animal pertencente ao “grupo controle” e outro submetido a um estado de estresse agudo) foi sacrificado, independentemente das outras. O método de sacrifício utilizado foi o do traumatismo craniano, retirando-se de cada animal, o mais rapidamente possível, o coração, que foi dividido sempre em duas partes. As partes de cada coração do “grupo-controle” e as dos submetidos a estresse agudo foram fixados no líquido de Gendre a 4°C, durante 24 h (glicogênio) e as restantes, congeladas a -30°C (lipídios).

Nosso primeiro passo foi o de comprovar o estado de estresse agudo dos ratos. Para tanto, escolhemos o método de detecção de lipídios localizados no córtex das glândulas supra-renais e o da concentração de glicogênio hepático ¹⁴. As glândulas supra-renais, uma vez extirpadas, também foram congeladas a -30°C e, a seguir, cortadas em crióstato (8,0 µm de espessura). O método utilizado para a demonstração de lipídios em geral nas supra-renais foi o do “Sudan black B” ¹⁵. Fragmentos dos fígados, após inclusão em parafina, foram cortados em micrótomo (5,0 µm de espessura). O método de escolha para identificação de glicogênio foi o do PAS (ácido periódico Schiff), segundo McManus ¹⁶, com controle pela amilase salivar.

No que concerne à demonstração de lipídios em geral, nos cortes dos corações dos seis ratos, foi usado o método do “sudan black B”. Para o glicogênio, seguimos a rotina referida no parágrafo anterior.

RESULTADOS

No córtex das glândulas supra-renais dos ratos submetidos a estado de estresse agudo, os lipídios mostraram-se diminuídos, em relação ao “grupo controle”, no qual verificamos intensa sudanofilia. Os fígados dos ratos submetidos ao estresse agudo mostraram ausência quase total de glicogênio, quando comparados aos do “grupo controle”.

Os resultados histoquímicos nos corações estão contidos nas tabelas I a III.

DISCUSSÃO

No presente trabalho escolhemos, fundamentados em Marcondes de Almeida ¹³, como agente alarmógeno, o formol. Realmente, dentre os vários alarmógenos, acreditamos ser o formol o único desenca-

Tabela I - Resultados da detecção histoquímica e lipídios em geral pelo “sudan black B” na fibra cardíaca dos ratos albinos do “grupo controle” e em estresse agudo.

	“Grupo controle”	Grupo estresse agudo
1.º experimento	1 +	3 +
2.º experimento	1 +	3 +
3.º experimento	1 +	3 +

n + = positividade fraca; 3 + = positividade intensa.

Tabela II - Resultados da detecção histoquímica da natureza dos lipídios pela reação do sulfato de azul do Nilo na fibra cardíaca dos ratos albinos do “grupo controle” e em estresse agudo.

	“Grupo controle”	Grupo estresse agudo
1.º experimento	1 + (azul)	3 + (azul)
2.º experimento	1 + (azul)	3 + (azul)
3.º experimento	1 + (azul)	3 + (azul)

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

Tabela III - Resultados da detecção histoquímica de glicogênio na fibra cardíaca dos ratos albinos do “grupo controle” e em estresse agudo.

	“Grupo controle”	Grupo estresse agudo
1.º experimento	2 +	2 +
2.º experimento	2 +	2 +
3.º experimento	2 +	2 +

2 + = positividade moderada. Obs.: material não resistente à amilase salivar.

deador do estresse agudo, que, nas condições de nosso experimento, não levaria o animal a um estado de hipoxia que pudesse interferir nos resultados.

O formaldeído, utilizado pela primeira vez por Selye ¹⁴, como agente alarmógeno, produz, segundo esse pesquisador, “síndrome geral de adaptação”, principalmente por sua ação tecidual no local da injeção. Graças a seu efeito sobre as proteínas, motivo pelo qual é utilizado em histologia como fixador, em injeções subcutâneas ou intraperitoneais, acarreta necrose de coagulação localizada. A extensão dessa necrose depende da concentração do formol. Com a administração de doses pequenas, a quantidade absorvida pela circulação sistêmica não é mortal nem produz lesões orgânicas específicas importantes. Os únicos efeitos dessas doses são as alterações não específicas ¹⁴.

Durante todo o experimento, os animais, tanto do “grupo-controle” quanto do submetido ao estresse agudo, permaneceram em jejum absoluto, para que não houvesse diferença na quantidade de alimento ingerido, estimulada pelo próprio estresse agudo. Quase todas as deficiências nutritivas, qualitativas ou quantitativas podem atuar como poderoso estímulo alarmógeno ¹⁴.

O jejum prolongado deve ser considerado como fator de estresse pois, ainda que atue lentamente, produz alterações características, tais como aumento da supra-renal, atrofia tímico linfocitária, hipocloridria, hipoglicemia, seguida de hiperglicemia, hemoconcentração e lesões gastrintestinais ¹⁴. Nosso tempo de experiência não foi, contudo, suficientemente

longo para que o jejum, por si só, levasse a um estado de estresse agudo, uma vez que a supra-renal dos ratos do “grupo-controle” se mostrou rica em lipídios.

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.

O teor de glicogênio da fibra cardíaca mostrou-se similar em ambos os grupos. Essa observação é de dupla indicação. Em 1.º lugar, mostra que o alarmógeno não induz biossíntese de glicogênio o que, aliás, está de acordo com o resultado obtido para a reação da fosforilase ativa¹⁷, cuja atividade também foi similar em ambos os casos. Em 2.º lugar, indica que não houve degradação daquele polissacarídeo. Esse informe é bastante significativo, pois, além de afastar a possibilidade de hipoxia (fato também confirmado pela reação da desidrogenase láctica)¹⁷, sugere que esse substrato não seria mobilizado para atender os ajustes metabólicos críticos, quando da vigência do estresse agudo. Realmente, segundo Opie⁵, somente em condições extremas, tal como anoxia, o glicogênio cardíaco é mobilizado.

Nossos resultados (reação do sulfato de azul do Nilo) fornecem evidências bastante convincentes de que, durante o estresse agudo produzido pelo formol, as células musculares cardíacas utilizam ácidos graxos livres como combustível principal e em maior grau do que o observado no “grupo-controle”. Entretanto, tudo leva a crer que a maior concentração de lipídios nos animais submetidos ao alarmógeno não seria plausível sem que um concomitante equivalente glicolítico estivesse presente^{18,19}. Com efeito, a forma mais adequada de armazenamento de lipídios no organismo animal é a de triglicerídeos, qualquer que seja a estrutura anatômica, o que determinaria, no presente caso, maior consumo de glicose. Estando a beta oxidação dos ácidos extremamente funcionando durante o estresse agudo, esse armazenamento de lipídios é apenas transitório, não vindo a constituir verdadeiro acúmulo dos mesmos¹⁹.

No 1.º ou 2.º dia de jejum, o teor de glicogênio hepático decresce rapidamente, permanecendo em níveis baixos por extensos períodos. Curiosamente, a glicemia é mantida em limites próximos aos do fisiológico por 4 ou mais semanas, graças à função glicostática do fígado, à mercê da utilização de triglicerídeos. Dessa forma, a glicemia não seria fator limitante para que o músculo cardíaco modificasse sua taxa normal de consumo do carboidrato.

O estresse agudo promove aumento das catecolaminas no sangue, as quais acarretam maior trabalho cardíaco com aumento da demanda metabólica. Há, contudo, nessas condições de estresse, diminuição no teor de noradrenalina da fibra cardíaca, por incapacidade do miocárdio em captar ou reter a mesma.

Tal aumento de catecolaminas circulantes promove ainda, através de sua atividade lipotrópica, aumento dos triglicerídeos no sangue, cuja hidrólise pela lipase lipoprotéica fornece ácidos graxos livres, aumentando seu nível sanguíneo nas condições de estresse agudo, com maior oferta dos mesmos ao coração. Sua captação pela célula miocárdica parece ocorrer por processo passivo e dependente de sua concentração no sangue arterial¹⁰.

Scheuer e Penargkul¹⁹ admitem ser essa captação do substrato freqüentemente superior à necessidade do órgão, o que implicaria esterificação e armazenamento para posterior utilização.

Em nosso trabalho, comprovamos acúmulo de lipídios no miocárdio dos ratos submetidos ao estresse agudo, sendo que a técnica histoquímica do sulfato de azul do Nilo demonstrou tratar-se predominantemente de ácidos graxos.

O real significado desse acúmulo de lipídios na fibra cardíaca, na vigência do estresse agudo causado pelo formol, permanece obscuro. Poderíamos, contudo, aventar duas hipóteses: substância energética de reserva ou dificuldade de mobilização após ser acumulado.

Em nosso entender, achamos bastante razoável o primeiro aspecto, pois sendo o coração um órgão francamente adaptado para consumir ácidos graxos livres e até acumulá-los como triacilglicerídeos¹⁹, seria mesmo coerente que se valesse o organismo dessa propriedade para, numa situação de lipólise anômala, retirar da circulação sanguínea esses lipídios. Portanto, essa reserva adicional de lipídios dotaria o coração de combustível facilmente mobilizável, já intracelular, para uma posterior fase de recuperação, uma vez superado o período de estresse agudo.

O estudo ultra-estrutural¹⁷ demonstra claramente que uma das principais diferenças observadas entre a fibra cardíaca dos ratos em estresse agudo produzido pelo formol e a do “grupo-controle” diz respeito ao maior número de gotículas de lipídios encontradas entre as miofibrilas dos animais submetidos ao alarmógeno; tais achados confirmam os resultados histoquímicos referentes à detecção de lipídios.

Em resumo, o músculo cardíaco, quando submetido a estresse agudo causado pelo formol, é induzido a desenvolver carga adicional de trabalho¹⁷, a qual promove acúmulo de ácido graxo na forma esterificada e o glicogênio não participa de tal alteração.

SUMMARY

A histochemical study on the effect of formaldehyde induced acute stress on the glycogen and lipid content of heart muscle of albino rats was carried out. Twelve animals were used, six of them constituting a control group and six being submitted to acute stress. Glycogen was studied using the PAS technique, controlled through salivary amylase. The

degree of positivity of this substance in both groups was similar. The lipids in general were developed in the heart muscle fiber with the Sudan black B technique. An increase of this substance was found in the heart muscles of rats during acute stress. The Nile blue sulfate technique showed that acid radicals predominated among these lipids.

REFERÊNCIAS

1. Bing, R. J.; Siegel, A.; Vilate, A.; Badboni, F.; Sparks, E.; Taeschler, M.; Klapper, M.; Edwards, S. - Metabolic studies on the human heart in vivo. I. Studies on carbohydrate metabolism of human heart. *Am. J. Med.* 15: 284, 1953.
2. Bing, R. J.; Siegel, A.; Ungar, I.; Gilbert, M. - Metabolism of the human heart. II. Studies on fat, ketone and amino acid metabolism. *Am. J. Med.* 16: 504, 1954.
3. Bing, R. J. - Myocardial metabolism. *Circulation*, 12: 635, 1955.
4. Bing, R. J. - Cardiac metabolism. *Physiol. Rev.* 45: 171, 1965.
5. Opie, L. H. - Metabolism of the heart in health and disease. Part I. *Am. Heart J.* 76: 685, 1968.
6. Opie, L. H. - Metabolism of the heart in health and disease. Part III. *Am. Heart J.* 77: 383, 1969.
7. Opie, L. H. - Metabolism of the heart in health and disease. Part II. *Am. Heart J.* 77: 100, 1969.
8. Neely, J. R.; Rovetto, M. J.; Oram, J. F. - Myocardial utilization of carbohydrate and lipids. *Progr. Cardiovasc. Dis.* 15: 289, 1972.
9. Hecht, A. - Enzyme histochemistry of heart muscle in normal and pathologic conditions. In: Bajusz, E., Jasmin, G., ed. - *Methods of Achievement in Experimental Pathology*. Karger Press, Montreal, 1971. V. 5. p. 384.
10. Ballard, F. B.; Danforth, W. H.; Neagle, S.; Bing, R. J. - Myocardial metabolism of fatty acids. *J. Clin. Invest.* 39: 717, 1960.
11. Evans, G. - The glycogen content of the rat heart. *J. Physiol. (Lond.)*, 82: 468, 1934.
12. Ribeiro do Valle, J. - Colonia de ratos 2 Baw. *Cienc. e Cult. (São Paulo)*, 1: 156, 1949.
13. 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 norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia). São Paulo, 1968. Tese, Escola Paulista de Medicina.
14. Selye, H. - Stress. The physiology and pathology of exposure to stress. A treatise based on the concepts of the general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *Acta Inc.*, Montreal, 1950.
15. Lison, L. - *Histochimie et cytochimie animales; principes et méthodes*. 3 ed. Gauthier-Villares, Paris, 1960.
16. McManus, J. F. A. - Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature (Lond.)*, 158: 202, 1946.
17. Lopes, A. C. - Influência de "stress" agudo provocado pelo formol sobre o metabolismo da fibra cardíaca do rato albino. São Paulo, 1978. Tese, Escola Paulista de Medicina.
18. Scheuer, J. - Myocardial metabolism in cardiac hypoxia. *Am. J. Cardiol.* 19: 385, 1967.
19. Scheuer, J.; Penpargkul, S. - Myocardial metabolism. In: Willerson, J. T.; Sanders, C. A., ed. - *Clinical Cardiology*. Grune & Stratton, N. York, 1977. p. 47.