

ASPECTOS ULTRA-ESTRUTURAIS DOS CARDIOMIÓCITOS ATRIAIS DE RATOS ALBINOS SUBMETIDOS À AÇÃO DO FRIO

LUIZ BORROTCHIN, ANTÔNIO CARLOS LOPES, OSWALDO ALVES MOURA, MANUEL DE JESUS SIMÕES, CELSO FERREIRA, NADER WAFEE.

Foi estudada a ultra-estrutura dos cardiomiócitos atriais de ratos submetidos à ação do frio. Foram utilizados 8 ratos adultos, distribuídos ao acaso em dois grupos: grupo I, controle; grupo II, colocados em gaiolas metálicas, sem alimentação e água, dentro de um criostato a -20°C durante quatro horas. A seguir, os animais foram sacrificados e fragmentos dos átrios direitos fixados para microscopia eletrônica.

Os resultados mostraram fibras cardíacas bem alteradas, onde se observa apagamento e lise em grau variável das cristas mitocondriais (cristólise no grupo submetido ao estresse pelo frio). Os autores discutem ainda os possíveis fatores que poderiam ter influenciado tais alterações.

Arq. Bras. Cardiol. 53/1: 19-22 — Julho 1989.

A ação calorígenica das catecolaminas, principalmente da noradrenalina liberada pelo sistema nervoso simpático, é a principal responsável pelo desenvolvimento da resistência ao frio¹. Esse efeito foi demonstrado por Jansky e col² ao verificar que injeções de noradrenalina produziam um aumento marcante no metabolismo basal, proporcional ao grau de adaptação ao frio que, segundo Selye³, é uma forma de estresse.

Com relação ao miocárdio, Sacchi^{4,5} estudou ratos submetidos à temperatura corporal de 15 a 17°C. Essa autora descreveu entre outras as seguintes alterações: atenuação da estriação transversal das miofibrilas, dilatação do sistema transversal do retículo sarcoplasmático, opacificação da matriz, edema e perda de parte das cristas mitocondriais, chegando à substituição por volumosos vacúolos. Observou-se também uma diminuição do conteúdo de glicogênio intracelular sugerindo sua maior utilização como substrato energético nessas condições.

Abedin e col⁶ relacionaram as alterações ultra-estruturais e eletrocardiográficas de ratos submetidos a 18°C. Os animais foram sacrificados no momento exato em que se iniciaram arritmias cardíacas. Ao microscópico eletrônico, a única alteração encontrada foi uma nítida separação dos discos intercalares, particularmente ao nível da fascia adherens. Esses mesmos autores estudaram também a recuperação desses animais, sacrificando um grupo 18 a 24 horas após o início das arritmias, não observando nesse momento as alte-

rações ultra-estruturais ou eletrocardiográficas citadas.

Prosseguindo esta linha de pesquisa e levando em consideração a literatura por nós apresentada, propusmo-nos realizar um estudo ultra-estrutural dos cardiomiócitos atriais de ratos albinos submetidos à hipotermia profunda.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 8 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem EPM-Wistar, com idade de 90 dias.

Os ratos foram divididos ao acaso em 2 grupos. Grupo I, controle; grupo II, colocado em gaiolas metálicas, sem alimentação e água, dentro de um criostato a -20°C durante 4 horas.

Todos os animais foram sacrificados por concussão craniana e imediatamente era realizada a abertura do tórax, exposição e remoção do coração e, sobre o mesmo, ainda com batimentos, gotejava-se solução fixadora gelada de glutaraldeído a 2%. A seguir, procedia-se a retirada do átrio direito, o qual era fixado em glutaraldeído a 2% em tampão fosfato e processado segundo as técnicas habituais para inclusão e observação à microscopia eletrônica. Os preparados foram examinados e fotografados em EM Zeiss 9s2-60 KV.

RESULTADOS

Grupo I (controle) — O átrio apresenta-se constituído por fibras musculares estriadas cardíacas (car-

diomiócitos) que estão representadas por células alongadas e ramificadas, envolvidas por um sarcolema. Os núcleos, geralmente um por célula, estão localizados na porção central da fibra. As fibras contêm dois tipos de miofilamentos (espesso, contendo miosina, e delgado, contendo actina), dispostos em feixes designados como miofibrilas. As mitocôndrias são muito abundantes, caracterizando-se por suas numerosas cristas; aglomeram-se na área em torno do núcleo, sob o sarcolema, entre os feixes de miofilamentos. Os cardiomiócitos apresentam ainda na região do núcleo (área perinuclear) grânulos eletrodensos, concentrados junto ao aparelho de Golgi (fig. 1).

Grupo II — nota-se que as fibras cardíacas apresentam mitocôndrias bem alteradas, onde se pode observar edema, apagamento e lise em grau variável das cristas, chegando ao desaparecimento e substituição das mesmas por áreas lacunares, ou seja, cristólise. As mitocôndrias em cristólise apresentam-se, em geral, com volume aumentado em relação àquelas com lise de cristas. Quanto às miofibrilas, observa-se uma grande heterogeneidade de padrões. Em alguns casos, encontra-se estrutura próxima da normalidade e, às vezes, rupturas com perda de sua continuidade. Notam-se também áreas em que os miofilamentos se encontram desarranjados e desintegrados no sarcoplasma com perda total de sua estrutura. Junto às faixas de contração, notam-se em algumas micrografias, zonas de desaparecimento dos miofilamentos com aspecto homogêneo correspondente à necrose parcial dos mesmos. Em relação aos grânulos atriais, observa-se menor concentração dos mesmos na região perinuclear (fig. 2).

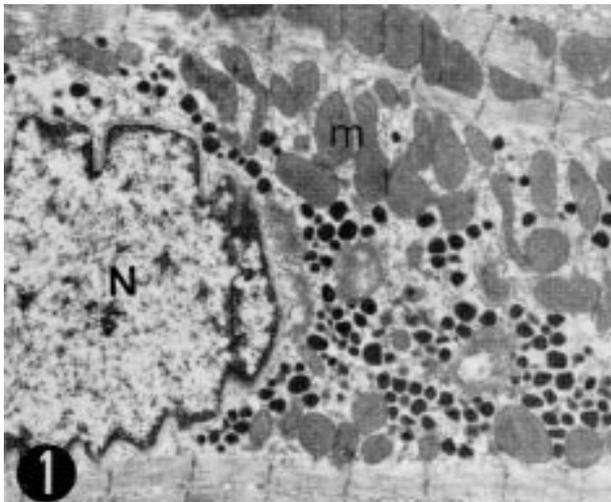


Fig. 1 — Eletromicrografia de corte longitudinal de cardiomiócito atrial de rato pertencente ao grupo controle. Observar na região paranuclear grânulos eletrodensos além de grande concentração de mitocôndrias (m). (N = núcleo). 7 200X.

DISCUSSÃO

A ação do frio sobre os cardiomiócitos atriais de ratos albinos permite-nos constatar, ao microscópio

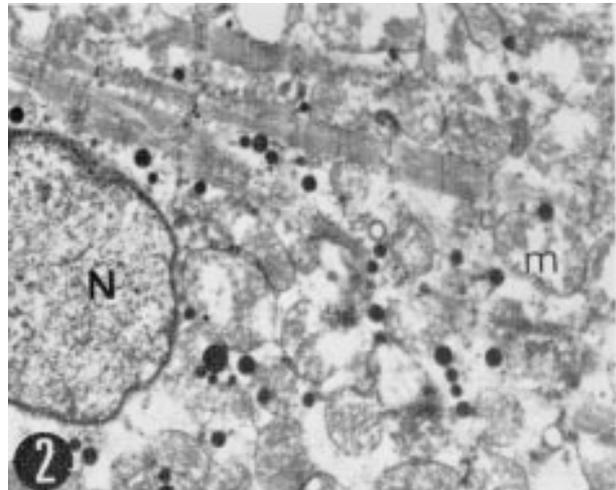


Fig. 2 — Eletromicrografia de corte longitudinal de cardiomiócito atrial de rato submetido ao estresse pelo frio. Notar grande concentração de mitocôndrias a maioria alterada (m) e grânulos eletrodensos dispersos pelo sarcoplasma. (N = núcleo). 7 200X.

eletrônico, alterações de miofibrilas caracterizadas pelo afastamento e desorganização dos miofilamentos, perda de sua estruturação típica, por vezes com rupturas, homogeneização e mesmo necrose parcial. É freqüente o aparecimento de faixas de contração.

Observa-se também uma diminuição na concentração de grânulos atriais nas áreas paranucleares. Esses resultados, segundo Buchner⁷, são indicativos de um estado de hipóxia aguda. No entanto, as alterações mais eletivas desse estado foram encontradas nas cristas mitocondriais. Essas constituíram-se por afastamentos, apagamentos, rupturas, lise parcial e total, chegando a formar áreas lacunares correspondentes às mitocôndrias com cristólise. Uma revisão exhaustiva da literatura foi improdutivo, já que não encontramos relatos com os métodos aqui utilizados.

Em nosso estudo, utilizaram-se fibras atriais com base na semelhança ultra-estrutural entre essas e as ventriculares, conforme descrito por McNutt e Fawcett⁸. Poder-se-ia assim observar o comportamento dos componentes celulares existentes nos cardiomiócitos em geral, acrescidos dos grânulos atriais.

É necessário salientar que as alterações encontradas em nosso trabalho assemelham-se àquelas descritas na literatura, decorrentes da ação da hipóxia e das catecolaminas sobre os cardiomiócitos.

Assim é que Caulfield e Kliensky⁹, após a ligadura experimental da artéria coronária em ratos albinos, demonstraram alterações isquêmicas representadas por edema intracelular abrangendo o citosol, o retículo sarcoplasmático e o complexo de Golgi, desorganização de miofilamentos, das faixas de contração e alterações mitocondriais. Estas últimas, após 15 minutos de hipóxia, já começaram a apresentar edema e, após 4 horas, as cristas sofreram rupturas e mesmo desaparecimento total. Parece lícito inferir que esses achados, de certa forma, consubstanciam os nossos resultados, pois nossos animais também permaneceram

4 horas sob a ação do frio, o mesmo tempo utilizado pelos autores citados para a produção da hipóxia.

Ferrans e Roberts^{10,11}, utilizando várias espécies animais, dentre as quais ratos, estudaram a produção de hipóxia por alterações na circulação coronária e pela administração de drogas que alteram o metabolismo da fibra cardíaca, aumentando o consumo de oxigênio ou prejudicando sua utilização. Esses autores descreveram o aparecimento de lesões focais semelhantes àquelas descritas nos nossos animais submetidos ao frio, produzidas por catecolaminas exógenas. Isto demonstra que as catecolaminas liberadas em função de vários fatores também o foram pela ação do frio, um "alarmógeno" que atua produzindo um estado de estresse agudo³.

Quanto à necrose causada pela epinefrina, foi descrita por Ferrans e col¹¹ em ratos da raça Holtzmann, que também encontraram faixas de contração, desorganização de miofilamentos, mitocôndrias apresentando redução das cristas. Chamam atenção esses autores para o fato de que as áreas de maior degeneração mitocondrial se encontravam necróticas.

Comparando os nossos resultados com os de Ferrans e col¹¹, fica nítida a semelhança quanto às alterações ultra-estruturais descritas no sarcoplasma e nas mitocôndrias. Contudo, em nossas micrografias eletrônicas, não foi possível observar áreas de necrose típica. Tal fato poderia estar relacionado ao tipo de experimento e mesmo ao tempo de ação do alarmógeno, pois, em nosso trabalho, foi de apenas 4 horas. É possível que tempos mais prolongados ou temperaturas mais baixas possam produzir tais alterações. Em algumas micrografias eletrônicas observamos imagens semelhantes à necrose parcial de miofilamentos, tomando como parâmetro a figura de número 8 do trabalho de Buchner⁷.

O encontro de faixas de contração foi estudado por Hearse e col¹², que constataram serem as reservas miocárdicas de ATP as principais determinantes do início e da progressão da contratatura isquêmica, podendo esta ser acelerada pelos procedimentos que levam à uma diminuição do ATP. O maior fluxo intracelular de cálcio, determinado pelas catecolaminas circulantes¹³ e a falta de ATP para o relaxamento muscular¹⁴ seriam outros fatores que contribuiriam para a manutenção das faixas de contração.

Robbins e Cotran¹⁵; e Pontes¹⁶ verificaram perda de estabilização das membranas celulares durante a hipóxia. Esta, prejudicando a respiração aeróbica, leva a redução na formação de moléculas de ATP, com conseqüente ativação de glicólise anaeróbica, processo que determina acúmulo de ácido lático e fosfato inorgânico, provocando uma diminuição de pH intracelular. A baixa de ATP compromete também o mecanismo da bomba de sódio, que é dependente dessa fonte de energia, com retenção de íons sódio e, conseqüentemente, edema intracelular. Estes fatores, ou seja, a queda de pH e as alterações iônicas, provocariam

a desestabilização das membranas em geral, inclusive das mitocondriais, contribuindo para suas alterações estruturais.

Face ao exposto, acreditamos ter havido nos cardiomiócitos dos animais submetidos ao frio uma grande influência do fator hipóxia na gênese das lesões, pois a maior demanda metabólica causada por esse tipo de estresse não encontrou suporte energético nas mitocôndrias, que perderam a capacidade de produção de ATP, devido à profunda alteração de seus componentes. Naquelas mitocôndrias com cristólise total, haveria uma possível perda de DNA, tornando-se incapazes de se dividirem e, conseqüentemente, levando à irreversibilidade do processo.

Abedin e col¹, estudando a hipotermia profunda em ratos (18°C), encontraram alterações ultra-estruturais mínimas, caracterizadas apenas por afastamento dos discos intercalares, insignificantes quando comparadas aos nossos resultados. Porém, nessa temperatura referida, já detectaram nesses animais arritmias cardíacas de importância clínica.

Finalmente, gostaríamos de relevar a importância de estudos futuros em relação à sobrevivência desses animais e, em particular, tentar utilizar uma droga que pudesse minimizar os efeitos provocados pelo frio sobre os cardiomiócitos.

SUMMARY

The authors intended to study the fibers of atrial muscle of rats submitted to cold. The results specially showed the destruction of the mitochondria structure. The cristae are destroyed in part by the stress provoked. The possible factors that influence the stress provoked by the cold are discussed.

REFERÊNCIAS

1. Hshied ACL, Carlson LD — Role of adrenaline and noradrenaline in chemical regulation of heat production. *Am J Physiol*, 190: 243, 1957.
2. Jansky L, Bartunkova R, Zeisberger E — Acclimation of the white rat to cold: noradrenaline thermogenesis. *Physiol bohemoslov*, 16: 366, 1967.
3. 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. Montreal, Acta Inc, 1950.
4. Sacchi TB — Struttura del miocardio alle basse temperature corporae: ibernazione ed ipotermia generale profonda. *Sperimentale*, 119: 19, 1969.
5. Sacchi TB — Il miocardio del ratto esposto a bassa temperatura: ricerche al microscopio elettronico. *Boll soc ital Biol sper*, 50: 242, 1974.
6. Abedin Z, Cherney DD, Didio LJA — Myocardium of hypothermic rats with and without administration of Dextran: electrocardiographic and electron microscopic study. *Am J Path*, 35: 389, 1959.
7. Buchner F — Qualitative morphology of heart failure. *Meth Achiev Exp Pathol*, 5: 60, 1971.
8. McNutt NS, Fawcett DW — The ultrastructure of cat myocardium. *J Cell Biol*, 42: 46, 1969.
9. Caufield J, Klionsky B — Myocardial ischemia and early infarction: an electron microscopic study. *Am J Path*, 35: 389, 1959.

10. Ferrans VJ, Roberts WC — Myocardial ultrastructure in acute and chronic hypoxia *Cardiology*, 56: 146, 1971.
11. Ferrans VJ, Hibbs RG, Kelly HS et al — A histochemical and electronmicroscopic study of epinephrine-induced myocardial necrosis. *J molec cell Cardiol*, 1: 11, 1970.
12. Hearse DL, Garlick PB, Humphrey SM — Ischemic contracture of the myocardium, mechanism and prevention. *Am J Cardiol*, 39: 986, 1977.
13. Moretti A, Arcadi G, Laterza L et al — The effect of catecholamines and adrenergic blocking agents in the calcium and glucose content in the rat heart. *Farmacologia*, 1: 3, 1973.
14. Murray JM, Weber A — The cooperative action of muscle protein. *Sci Amer*, 230: 58, 1974.
15. Robbins SL, Cotran RS — Cell injury and cell death. In *Pathologic Basis of Diseases*. Philadelphia, Saunders, 1979. p. 22.
16. Pontes PAL — Comportamento do número de lisossomos nos fígados maternos e fetais de ratas albinas prenhes tratadas com diferentes doses de cloridrato de 2-(10-naftimetil)-imidazoline (nafazolina). São Paulo, 1981. (Tese dout Escola Paulista de Medicina).