

Remodelamento Miocárdico após Grandes Infartos Converte Potenciação Pós-pausa em Decaimento da Força em Ratos

Myocardial Remodeling after Large Infarcts in Rat Converts Post Rest-Potential in Force Decay

Danilo Sales Bocalini¹, Leonardo dos-Santos⁴, Ednei Luiz Antonio¹, Alexandra Alberta dos Santos¹, Ana Paula Dave³, Luciana Venturini Rossoni², Dalton Valentim Vassallo⁵, Paulo José Ferreira Tucci¹

Departamento de Medicina - Divisão de Cardiologia - Universidade Federal de São Paulo¹; Departamento de Fisiologia e Biofísica - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo², São Paulo, SP; Departamento de Biologia Estrutural e Funcional - Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas³, Campinas, SP; Departamento de Ciências Fisiológicas - Universidade Federal do Espírito Santo⁴; Departamento de Ciências Morfofuncionais - Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia⁵, Vitória, ES, Brasil

Resumo

Fundamento: A Contração pós-pausa (CPP) do músculo cardíaco fornece informações indiretas sobre a manipulação de cálcio intracelular.

Objetivo: Nosso objetivo foi estudar o comportamento da CPP e seus mecanismos subjacentes em ratos com infarto do miocárdio.

Métodos: Seis semanas após a oclusão coronariana, a contratilidade dos Músculos Papilares (MP) obtidos a partir de ratos submetidos à falsa cirurgia (C, n = 17), com infarto moderado (MMI, n = 10) e grande infarto (LMI, n = 14), foi avaliada após pausa de estímulos elétricos de 10 a 60 segundos antes e depois da incubação com cloreto de lítio (Li⁺) em substituição ao cloreto de sódio ou rianodina (Ry). A expressão proteica de Ca(2+)-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2), trocador Na⁺/Ca²⁺ (NCX), fosfolamban (PLB) e fosfo-Ser (16)-PLB foi analisada por Western blotting.

Resultados: Os ratos MMI apresentaram potenciação de CPP reduzida em comparação aos ratos C. Em oposição à potenciação normal para ratos C, foram observadas depressões de força pós-reposo nos músculos de ratos LMI. Além disso, a Ry bloqueou a depressão ou potenciação de PRC observada em ratos LMI e C; o Li⁺ inibiu o NCX e converteu a depressão em potenciação de CPP em ratos LMI. Embora os ratos MMI e LMI tenham apresentado diminuição no SERCA2 (72 ± 7% e 47 ± 9% de ratos controle, respectivamente) e expressão proteica de fosfo-Ser¹⁶-PLB (75 ± 5% e 46 ± 11%, respectivamente), a superexpressão do NCX (175 ± 20%) só foi observada nos músculos de ratos LMI.

Conclusão: Nossos resultados mostraram, pela primeira vez, que o remodelamento miocárdico pós-IAM em ratos pode mudar a potenciação regular para depressão pós-reposo, afetando as proteínas de manejo do Ca(2+) em miócitos. (Arq Bras Cardiol 2012;98(3):243-251)

Palavras-chave: Remodelamento cardíaco ventricular, infarto do miocárdio, relaxamento muscular, força muscular, ratos.

Abstract

Background: Post-rest contraction (PRC) of cardiac muscle provides indirect information about the intracellular calcium handling.

Objective: Our aim was to study the behavior of PRC, and its underlying mechanisms, in rats with myocardial infarction.

Methods: Six weeks after coronary occlusion, the contractility of papillary muscles (PM) obtained from sham-operated (C, n=17), moderate infarcted (MMI, n=10) and large infarcted (LMI, n=14) rats was evaluated, following rest intervals of 10 to 60 seconds before and after incubation with lithium chloride (Li⁺) substituting sodium chloride or ryanodine (Ry). Protein expression of SR Ca(2+)-ATPase (SERCA2), Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX), phospholamban (PLB) and phospho-Ser(16)-PLB were analyzed by Western blotting.

Results: MMI exhibited reduced PRC potentiation when compared to C. Opposing the normal potentiation for C, post-rest decays of force were observed in LMI muscles. In addition, Ry blocked PRC decay or potentiation observed in LMI and C; Li⁺ inhibited NCX and converted PRC decay to potentiation in LMI. Although MMI and LMI presented decreased SERCA2 (72±7% and 47±9% of Control, respectively) and phospho-Ser¹⁶-PLB (75±5% and 46±11%, respectively) protein expression, overexpression of NCX (175±20%) was only observed in LMI muscles.

Conclusion: Our results showed, for the first time ever, that myocardial remodeling after MI in rats may change the regular potentiation to post-rest decay by affecting myocyte Ca(2+) handling proteins. (Arq Bras Cardiol 2012;98(3):243-251)

Keywords: Ventricular remodeling; myocardial infarction; muscle relaxation; muscle strength; mice.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Danilo Sales Bocalini •

Rua General Chagas Santos, 392 - Saúde - 04146-050 - São Paulo, SP, Brasil
E-mail: bocalini@fcr.epm.br

Artigo recebido em 31/05/11, revisado recebido em 13/09/11; aceito em 20/09/11.

Introdução

No músculo cardíaco, tanto o influxo de cálcio (Ca^{2+}) pelo sarcolema quanto a liberação de Ca^{2+} no Retículo Sarcoplasmático (RS) contribuem para a ativação de miofilamentos durante a contração, e na maioria dos mamíferos, a liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} a partir do SR é quantitativamente dominante¹⁻³. Os mecanismos básicos celulares da contração muscular cardíaca são significativamente modulados pelo ritmo de estimulação. Assim, mudanças na frequência e no ritmo cardíaco são normalmente usadas como manobras experimentais para avaliar o comportamento ou revelar anormalidades na cinética de Ca^{2+} no acoplamento excitação-contração³. Assim, a Contração pós-pausa (CPP) permite uma avaliação indireta da função do RS^{2,4,5}. No miocárdio de ratos normais, a CPP é potencializada pelo Ca^{2+} adicional acumulado no RS durante a pausa em razão de atividade de Ca^{2+} -ATPase (SERCA2) no RS e da liberação fracionária de Ca^{2+} ^{2,5} mediante a ativação. Por outro lado, a CPP é negativamente modulada pelo efluxo de Ca^{2+} ao longo do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ^{1,2,6,7}.

O remodelamento ventricular que acontece após o Infarto do Miocárdio (IM) muitas vezes leva ao comprometimento da função contrátil do miocárdio poupado⁸⁻¹¹, estando associado ao comprometimento da manipulação intracelular Ca^{2+} ^{12,13}. Como resultado, foi proposto que a Potenciação pós-pausa pudesse ser alterada patologicamente por uma alteração na cinética do cálcio^{14,15}. Estudos anteriores descreveram redução da Potenciação pós-pausa nos músculos papilares do ventrículo esquerdo de ratos com IM curado de diferentes tamanhos de infarto^{9,10}. Recentemente, foi identificada, pela primeira vez, a depressão das contrações pós-reposo em ratos com insuficiência cardíaca crônica¹⁶. Considerando que os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à gênese da Contração pós-pausa no miocárdio de ratos após o remodelamento não estão completamente definidos, no presente relatório foi investigada a CPP do músculo papilar ventricular esquerdo remanescente do MI, e sua relação com o remodelamento molecular das principais proteínas de manipulação de Ca^{2+} .

Métodos

Animais

Ratos Wistar pesando 180-220 g foram tratados e utilizados de acordo com os *Principles of Laboratory Animal Care* (Publicação do NIH No. 86-23, revisados em 1985) e o protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (CEP# 0340/08).

Infarto do miocárdio experimental

O IM foi produzido pela ligadura da artéria coronária permanente, como descrito pelo nosso laboratório em publicações anteriores^{11,17}. Brevemente, sob anestesia (ketamina 50 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, via intraperitoneal) e ventilação artificial (Harvard Rodent Ventilator, modelo 863, Harvard Apparatus, Holliston, MA), foi feita uma toracotomia esquerda. O coração foi exteriorizado e a artéria coronária descendente anterior foi ligada com sutura de polipropileno 6-0. O coração

foi rapidamente reposicionado e o tórax foi fechado. Ratos submetidos à falsa cirurgia foram considerados o grupo controle (C). Todos os resultados morfológicos e funcionais foram avaliados seis semanas após a produção do IM.

Função cardíaca global e morfologia

A fim de caracterizar o IM, bem como as dimensões e a função do coração, foi realizado um ecocardiograma com Doppler em animais anestesiados (mesma mistura de ketamina com xilazina) seis semanas após a cirurgia. Esses procedimentos foram realizados por um observador cego à condição animal, usando um instrumento HP SONOS 5500 (Philips Medical System, Andover, MA, EUA) com um transdutor de 12 MHz a uma profundidade de 2 cm, de acordo com metodologia previamente descrita^{11,17,18}. Imagens transversais foram obtidas nos níveis basal (na extremidade das cúspides da valva mitral), médio (ao nível dos músculos papilares) e apical (distal ao músculo papilar, mas além do tampão da cavidade). O tamanho do infarto foi estimado como a identificação subjetiva de acinesia ou discinesia da parede ventricular esquerda (VE) em cada plano transversal e apresentado como o comprimento do arco correspondente ao segmento da cicatriz do IM em relação ao perímetro total da borda endocárdica do VE. Recentemente, demonstramos que essa medida ecocardiográfica está satisfatoriamente de acordo com a coloração histoquímica¹⁸. Os animais infartados foram divididos em dois grupos, de acordo com o tamanho do IM: um grupo composto de ratos com IM moderado, entre 20% e 39% do VE (MMI), e outro grupo de ratos com IM maior que 39% do VE (LMI).

Os diâmetros diastólico e sistólico final do VE foram medidos a partir do corte transversal paraesternal usando imagens em modo M. A função sistólica foi definida pela fração de encurtamento e calculada como a média percentual de variação entre os diâmetros diastólico e sistólico. A função diastólica foi analisada pela curva de velocidade de influxo diastólico mitral pelo Doppler pulsátil. A partir de uma vista de 4 câmaras, foram adquiridos o pico da onda E e velocidades da onda A e calculada a razão E/A.

Mecânica muscular cardíaca isolada

Imediatamente após o exame ecocardiográfico, foram feitas preparações *in vitro* do músculo papilar isolado do VE¹⁹. O coração foi rapidamente removido e colocado em solução Krebs-Henseleit oxigenada tamponada a 29 °C. O músculo papilar posterior do VE foi cuidadosamente dissecado e verticalmente inserido em um banho de órgãos aquecido a 29 °C e 100% oxigenado. O músculo foi acoplado a um transdutor de força isométrica (GRASS FT-03, Astro-Med, Inc. RI, EUA) conectado a um micrômetro para ajustes de comprimento muscular. A composição da solução de Krebs-Henseleit foi a seguinte (em mM): 135 NaCl; 4,69 KCl, 1,5 CaCl₂; MgSO₄ 1,16; KH₂PO₄ 1,18; 5,50 glicose, 10 U de insulina e 20 HEPES, tamponado a pH 7,4. As preparações foram estimuladas a 0,2 Hz, com 5 ms de pulsos de onda quadrada através de eletrodos de platina paralelos com tensões ajustadas para aproximadamente 10% a mais do que o mínimo necessário para produzir resposta mecânica máxima. Após 60 min de estabilização na condição de baixa carga, o músculo

foi carregado para contrair isometricamente e esticado até o máximo comprimento de sua curva de comprimento-tensão ($L_{máx}$). Os testes foram realizados em $L_{máx}$ (comprimento ideal para contração), e a tensão isométrica foi avaliada pela força normalizada para a área da seção transversal do músculo ($g\text{ mm}^{-2}$). Os seguintes parâmetros foram obtidos: Tensão de Repouso (TR), pico da Tensão Desenvolvida (TD) e sua primeira derivada (dT/dt), tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida (TPT) e tempo para 50% de relaxamento (TR50). CPPs relativas foram medidas em três grupos experimentais utilizando durações de pausa de 10, 15, 30, 45 e 60 segundos. A CPP relativa foi expressa como a amplitude da TD pós-reposo dividida pela TD em estado estacionário. Para investigar o papel do RS e NCX na CPP, esse protocolo foi repetido na presença de rianodina $1\ \mu\text{M}$ para inibir a função do RS^{20} , usando uma versão modificada de solução KH com zero $[\text{Na}^+]$ e 135 mM de cloreto de lítio (Li^+) para inibir a função do NCX^{21} . O Li^+ foi substituído por Na^+ , porque passa pelo canal de Na^+ , mantendo a excitabilidade do miócito enquanto os trocadores de membrana não são capazes de usar Li^+ para a troca²¹.

Parâmetros biométricos

Depois da remoção do músculo papilar, os ventrículos direito e esquerdo foram separados e pesados. O pulmão direito também foi excisado e pesado. Após secagem a $70\ ^\circ\text{C}$ durante 12h, o Teor de Água Pulmonar (TAP), considerado um índice de congestão, foi determinado utilizando a seguinte equação: $\text{TAP} (\%) = (\text{perda de peso após a secagem} / \text{peso úmido}) \times 100$.

Expressão proteica de SERCA2, fosfolambam e NCX

O teor de proteína foi analisado em amostras de VE remanescente dos grupos LMI, MMI e C após a excisão dos músculos papilares e cicatrização do infarto. Homogeneizados de tecido foram analisados por Western blotting de acordo com protocolos previamente descritos⁵ para comparar a expressão proteica de SERCA2, fosfolambam (PLB), fosfo-Ser¹⁶-PLB e NCX em todos os grupos experimentais. Amostras de miocárdios não infartados foram rapidamente congeladas a $-70\ ^\circ\text{C}$. Os tecidos foram homogeneizados em tampão de extração gelado (Tris 50 mM, EDTA 1 mM e sacarose mM 250, pH 7,4) usando Polytron (Polytron® PT2100, Kinematica AG, Littau, LU, SWI). Para preparar as frações microssomais de proteínas, foi feita uma centrifugação inicial a $10.000 \times g$ por 10 min a $4\ ^\circ\text{C}$. O sobrenadante foi centrifugado a $100.000 \times g$ por 60 min. O pellet, o que representa a fração microssomal, foi ressuspenso em tampão Tris-EDTA (Tris 50 mM, EDTA 1,0 mM, pH 7,4). Vinte e cinco microgramas de proteína do VE e padrões moleculares SDS-PAGE pré-colorados (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, EUA) foram separados por eletroforese em SDS-PAGE 7,5% ou 12% (para NCX ou SERCA2 e PLB, respectivamente) e, em seguida, transferidos para membranas de polivinil difluoreto durante a noite a $4\ ^\circ\text{C}$, usando um sistema celular de transferência Mini Trans-Blot (Bio-Rad) contendo Tris 25 mM, glicina 190mM, metanol 20% e SDS 0,05%. A eficiência de transferência e a igualdade de carga de proteína foram verificadas através da coloração de Ponceau S 1% (Caledon Laboratories, Georgetown, ON, CAN), previamente validado como uma alternativa eficiente para o controle de qualidade e carga das amostras²². Em seguida, a membrana foi bloqueada por 60 minutos à temperatura

ambiente em solução tamponada Tris (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,4) com 5% de leite desnatado em pó. Em seguida, a membrana foi incubada durante a noite a $4\ ^\circ\text{C}$ com anticorpos monoclonais de rato anti-NCX1 (dilução 1:1500, anticorpos suíços Swant®, Bellinzona, CH, SWI), anticorpos monoclonais de rato anti-SERCA2 (dilução 1:2.500, Abcam Inc., MA, EUA), anticorpos monoclonais de rato anti-PLB (0,25 mg/mL, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, EUA) ou anticorpos monoclonais anti-fosfo-Ser¹⁶-PLB de rato (1:1000, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, EUA). Após a lavagem, a membrana foi incubada por 90 min com um anticorpo IgG antirato conjugado com peroxidase de rábano silvestre (dilução 1:3000; Bio-Rad, CA, EUA). A membrana foi cuidadosamente lavada e os imunocomplexos foram detectados através de sistema de peroxidase de rábano silvestre/quimioluminescência com luminol (ECL Plus, Amersham International plc, Little Chalfont, UK) e, em seguida, submetida a autorradiografia. Parcelas de proteínas foram quantificadas pelo software Scion Image (Scion baseado em imagem NIH) em unidades arbitrárias de densidade óptica normalizadas por valores médios obtidos para as amostras C em cada membrana.

Análise estatística

Os resultados são expressos como média \pm EPM e analisados pelo teste *t* de Student ou por análise de variância (ANOVA mono ou bifatorial), seguidos pelo teste *post hoc* de Bonferroni, conforme o caso. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Softwares Inc., San Diego, CA, EUA) e as diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

Resultados

Biometria e ecocardiograma com Doppler

A tabela 1 mostra que os pesos dos ventrículos direito e esquerdo aumentaram no grupo LMI comparados aos controles (grupo C). O grupo MMI mostrou-se apenas parcialmente alterado em comparação com o grupo C, somente com índices de peso coração/corpo e VE/corpo aumentados. Esses parâmetros estiveram acompanhados por maior TAP no grupo LMI em comparação com os grupos MMI e C (tab. 1). Dados ecocardiográficos morfológicos e funcionais (tab. 1) sugerem dilatação das cavidades cardíacas associada a disfunção sistólica e diastólica em rato de ambos os grupos infartados, sendo que a maioria dos parâmetros avaliados mostrou-se mais extensivamente alterada no grupo LMI do que no grupo MMI.

Contratibilidade miocárdica in vitro

A área transversal foi maior no grupo LMI ($1,16 \pm 0,05\ \text{mm}^2$, $n = 14$) em comparação com o grupo MMI ($1,01 \pm 0,05\ \text{mm}^2$, $n = 10$) e o grupo C ($0,96 \pm 0,04\ \text{mm}^2$, $n = 17$). Como podemos ver na tabela 2, após seis semanas de oclusão coronariana, os parâmetros contráteis foram prejudicados nos grupos MMI e LMI em comparação com o grupo C, apresentando uma depressão da TD e da dT/dt positiva. No entanto, somente o grupo LMI mostrou depressão significativa da dT/dt negativa, bem como maior tempo de duração das fases de contração e relaxamento.

Tabela 1 – Parâmetros cardíacos

	Controle (n = 17)	IM moderado (n = 10)	Grande IM (n = 14)
Biometria			
C/PC (mg g ⁻¹)	2,72 ± 0,06	3,17 ± 0,08 *	3,43 ± 0,11 *
VD/PC (mg g ⁻¹)	0,68 ± 0,02	0,74 ± 0,02	0,94 ± 0,07 *
VE/PC (mg g ⁻¹)	2,20 ± 0,05	2,52 ± 0,08 *	2,61 ± 0,07 *
TAP (%)	79 ± 0,21	80 ± 0,31	82 ± 0,48 *
Ecocardiograma			
DDVE (cm)	0,72 ± 0,01	0,81 ± 0,02	0,98 ± 0,02 *
FE (%)	54,8 ± 2,04	37,4 ± 1,44 *	26,3 ± 1,94 *#
Razão E/A	2,15 ± 0,1	2,4 ± 0,2 *	4,86 ± 0,5 *#
Tamanho do infarto (%)	–	32,8 ± 1,6	44,8 ± 1,2 *

Os resultados são expressos como média ± EPM. IM - Infarto do miocárdio; C/PC - Coração indexado pelo peso corporal; VD/PC - razões do peso do ventrículo direito e do ventrículo esquerdo (VE/PC) para o peso corporal; TAP - Teor de água pulmonar; DDVE - Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; FE - Fração de encurtamento; E/A - Razão das velocidades da onda E/A. *p < 0,05 vs. Controle e #p < 0,05 vs. IM moderado. ANOVA monofatorial e teste post hoc de Bonferroni.

Na figura 1A, traçados originais ilustram o comportamento da CPP dos músculos papilares de ratos infartados e controles durante as pausas da estimulação. No grupo C, a potenciação da CPP ocorreu, o que aumentou com a duração da pausa. No entanto, nos músculos dos grupos infartados, o comportamento da CPP foi substancialmente alterado. Enquanto o grupo MMI apresentou uma redução nessa potenciação de CPP, os músculos no grupo LMI desenvolveram depressão da força após o repouso em comparação com contrações em estado estacionário. A depressão se acentuou com o aumento da duração da pausa (fig. 1B).

A fim de investigar os mecanismos da CPP em músculos papilares de ratos infartados, foram utilizadas ferramentas farmacológicas (fig. 2) e moleculares (fig. 3). Tendo em vista que

Tabela 2 – Mecânica do músculo papilar em L_{máx}

	Controle (n = 17)	IM moderado (n = 10)	Grande IM (n = 14)
TD (g mm ⁻²)	5,04 ± 0,41	4,03 ± 0,18 *	2,9 ± 0,20 *#
TR (g mm ⁻²)	1,15 ± 0,07	1,19 ± 0,12	1,48 ± 0,16 *
+dT/dt _{max} (g mm ⁻² s ⁻¹)	53,35 ± 4,43	40,26 ± 1,93 *	25,76 ± 2,33 *#
-dT/dt _{max} (g mm ⁻² s ⁻¹)	-31,04 ± 2,44	-22,57 ± 1,00	-19,60 ± 1,93 *
TPT (ms)	157 ± 8	175 ± 8	210 ± 6 *
TR50 (ms)	149 ± 10	162 ± 9	202 ± 7 *

Os resultados são expressos como média ± EPM da tensão desenvolvida (TD); IM - Infarto do miocárdio; TR - Tensão de repouso; +dT/dt_{max} - taxa máxima de desenvolvimento de tensão e declínio (-dT/dt_{max}); TPT - Tempo para o pico de tensão; TR50 - Tempo para 50% de relaxamento. *p < 0,05 vs. Controle e #p < 0,05 vs. IM moderado. ANOVA monofatorial e teste post hoc de Bonferroni.

apenas o grupo LMI exibiu o comportamento incomum da CPP, os seguintes protocolos farmacológicos foram realizados apenas no grupo C; no grupo LMI foram feitas preparações papilares. A administração de Ry (1 μM, durante 30 min) na solução de Krebs-Henseleit aboliu completamente a potenciação de CPP no grupo C e a depressão de CPP no grupo LMI (fig. 2A). Por outro lado, o bloqueio de NCX com uma solução de Krebs-Henseleit modificada contendo Li⁺ em vez de Na⁺ promoveu uma ligeira melhora na contração relativa CPP no grupo C e restabeleceu o comportamento normal no grupo LMI, convertendo a depressão de CPP para um perfil de potenciação de CPP (fig. 2B).

Teor de proteínas por Western blotting

Em todos os grupos, foram investigadas proteínas de manipulação cálcio possivelmente envolvidas nessas alterações (fig. 3). O remodelamento miocárdico após o infarto levou a uma diminuição do teor de SERCA2: embora o grupo MMI tenha apresentado diminuição moderada da expressão proteica de SERCA2, foi alcançada significância apenas no grupo LMI (fig. 3A). O PLB total mostrou-se significativamente reduzido tanto no grupo MMI (79 ± 12% do teor de C) quanto no grupo LMI (65 ± 10% do teor de C). Sua forma fosforilada (Ser¹⁶-PLB) também se apresentou reduzida nos grupos infartados (fig. 3B). Embora o teor de proteína NCX não tenha se alterado no grupo MMI quando comparado ao grupo C, esse mesmo teor mostrou-se aproximadamente 1,7 vez mais expressivo no grupo LMI (fig. 3C).

Discussão

Nossos resultados mostram que o remodelamento miocárdico pós-IM em ratos pode mudar a potenciação regular pós-reposo para pós-depressão da força ativa afetando proteínas de manejo do Ca²⁺ em miócitos. Esse comportamento incomum da mecânica do miocárdio mostrou-se evidente apenas em animais com grande infarto, em que o processo de remodelamento incluiu não apenas dilatação do VE com disfunção sistólica e diastólica, mas também pior contração e relaxamento do miocárdio, provavelmente pela deficiência de captação de SR Ca²⁺ e efluxo excessivo de Ca²⁺ do sarcolema.

Disfunção ventricular no IM e dilatação das cavidades cardíacas, normalmente observadas em ratos com infartos maiores²³, também são mostradas no presente estudo. O remodelamento pós-IAM esteve associada com a diminuição do desenvolvimento de tensão nos músculos papilares de ratos infartados e taxa reduzida de geração de força e relaxamento, como relatado anteriormente para os músculos papilares^{9,10,13,20,24}. Identificou-se também um comprometimento similar do encurtamento em miócitos ventriculares isolados^{25,26}, e os mecanismos propostos para explicar a disfunção contrátil incluem defeitos no acoplamento excitação-contração^{13,24}.

Contrações pós-reposo no músculo cardíaco

Durante o repouso do miocárdio, o Ca²⁺ é removido do citosol para o RS por SERCA2 ou para a mitocôndria pelo uniportador de Ca²⁺, ou é expulso pelo NCX e Ca²⁺-ATPase do sarcolema¹. Nos protocolos de CPP como o utilizado no presente trabalho, a potenciação da TD ocorre depois de uma pausa de estímulos, como esperado para o músculo cardíaco de ratos. Normalmente, como a maior parte do Ca²⁺ retorna ao

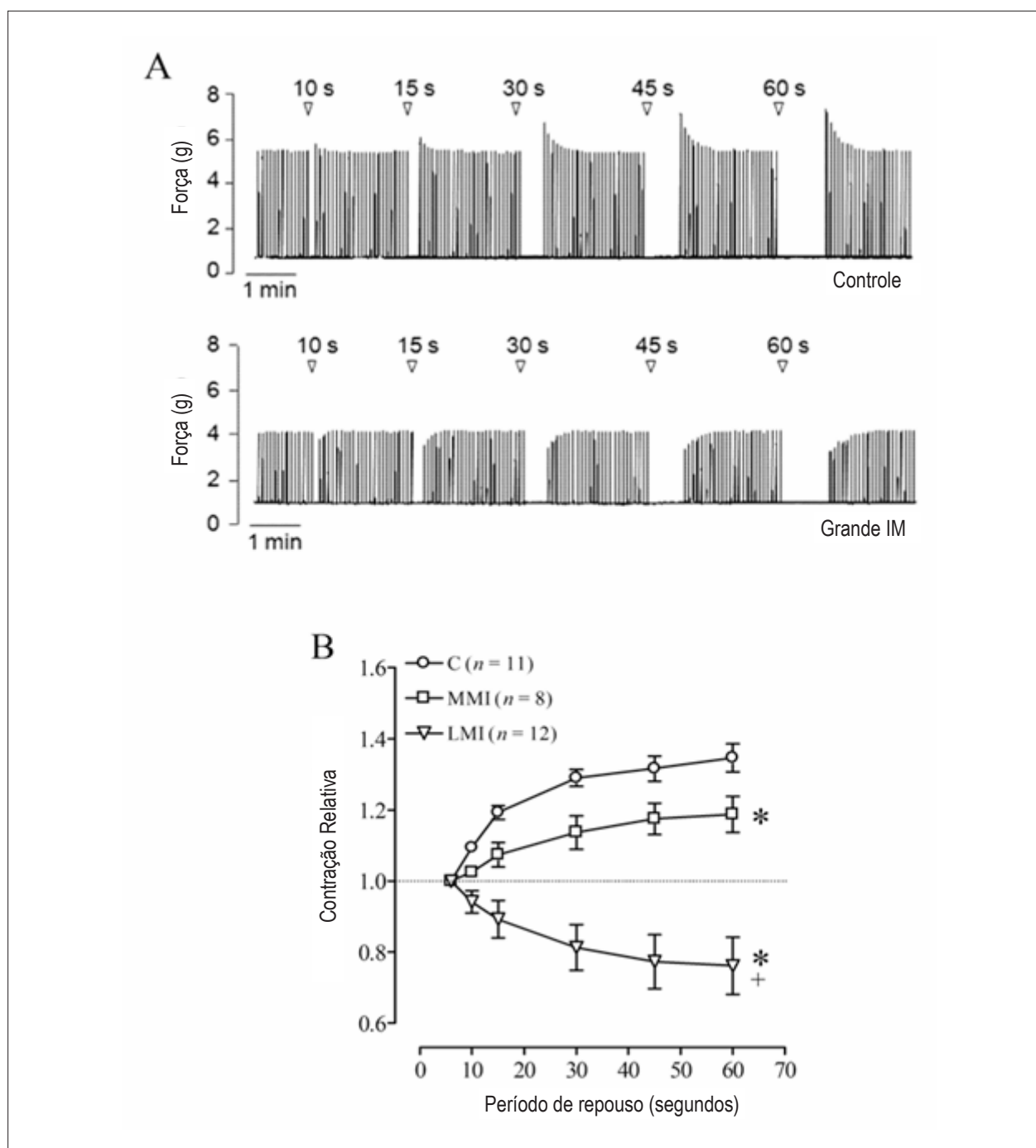


Fig. 1 – Contração pós-pausa das preparações do músculo papilar isolado. Painel A, traçados típicos representando a força desenvolvida do músculo papilar de ratos controle (superior) e de grande IM (inferior) antes e depois da pausa de estímulo (10 a 60 seg). A potenciação de contrações pós-reposo é evidenciada no grupo controle, ao passo que depressões de força pós-reposo ocorreram no músculo de ratos com grande IM. Painel B, Efeito do prolongamento das pausas (média \pm EPM) sobre a contração relativa (CPP dividida pela contração em estado estacionário) do grupo controle (C), grupo de infarto moderado (MMI) e grande infarto (LMI). ANOVA bifatorial e testes post hoc de Bonferroni para dados * $p < 0,05$ vs C. * $p < 0,05$ vs. MMI.

RS durante o período de repouso, seu teor tende a aumentar com o prolongamento da pausa, aumentando também a liberação de Ca^{2+} e, por fim, a geração de força sobre a próxima ativação¹. Na verdade, a administração de Ry para bloquear a função do RS nos nossos experimentos aboliu completamente

a potenciação dos músculos no grupo C, reforçando estudos anteriores que descrevem o papel fundamental da função de armazenamento do RS nesse fenômeno⁴. Por outro lado, a inibição da extrusão de Ca^{2+} pelo sarcolema pelo NCX em nossas preparações (usando Li^+) aumentou a potenciação dos

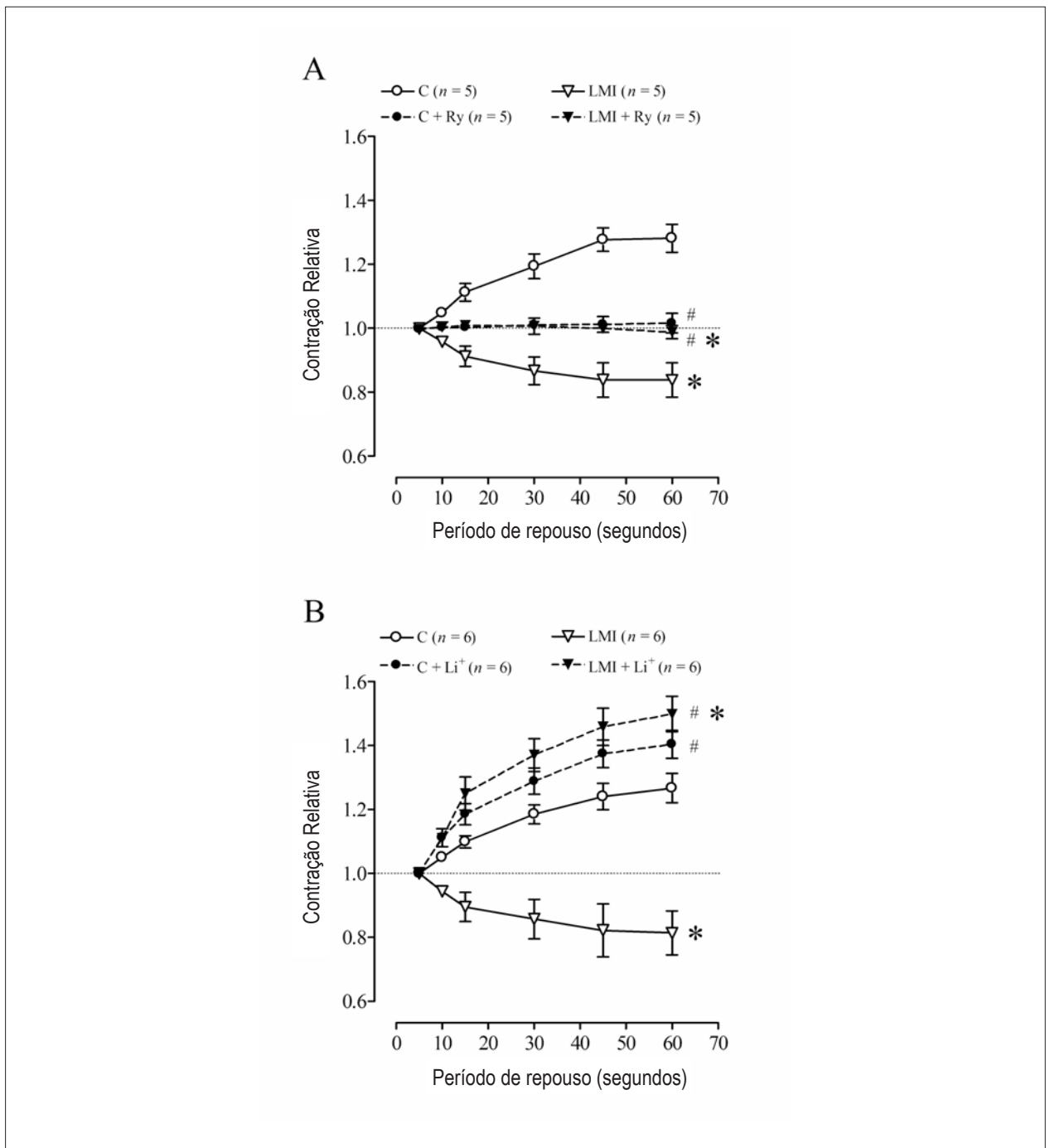


Fig. 2 – Efeitos da rianodina (Ry) e cloreto de lítio (Li⁺) nas contrações pós-reposo. Painel A, Potenciação e depressão pós-reposo de contrações foram abolidas após adição de 1 μM Ry em preparações dos grupos controle (C) e grande infarto (LMI), respectivamente. Painel B, substituição de Li⁺ por sódio na Potenciação pós-pausa intensificada por solução tampão no grupo C, e conversão da depressão para potenciação no grupo LMI. *p < 0.05 vs. Grupo C, sem intervenções farmacológicas. #p < 0,05 vs. antes de Ry ou Li⁺. ANOVA bifatorial e teste post hoc de Bonferroni. Os símbolos representam Média ± EPM.

músculos C, o que confirma a importância dos mecanismos de efluxo de Ca²⁺ para modular negativamente a CPP do músculo do VE dos ratos^{6,7}. De fato, relatou-se que a estimulação do NCX leva a um aumento do efluxo de Ca²⁺ e influxo de Na⁺ e, conseqüentemente, a uma diminuição da CPP^{27,28}

Depressão pós-reposo no músculo cardíaco de ratos

Diversos relatos investigaram o remodelamento miocárdico pós-infarto e disfunção contrátil, tendo apontado deficiências na movimentação de Ca²⁺ em cardiomiócitos^{13,29-31}. A literatura é controversa a respeito do comportamento da CPP

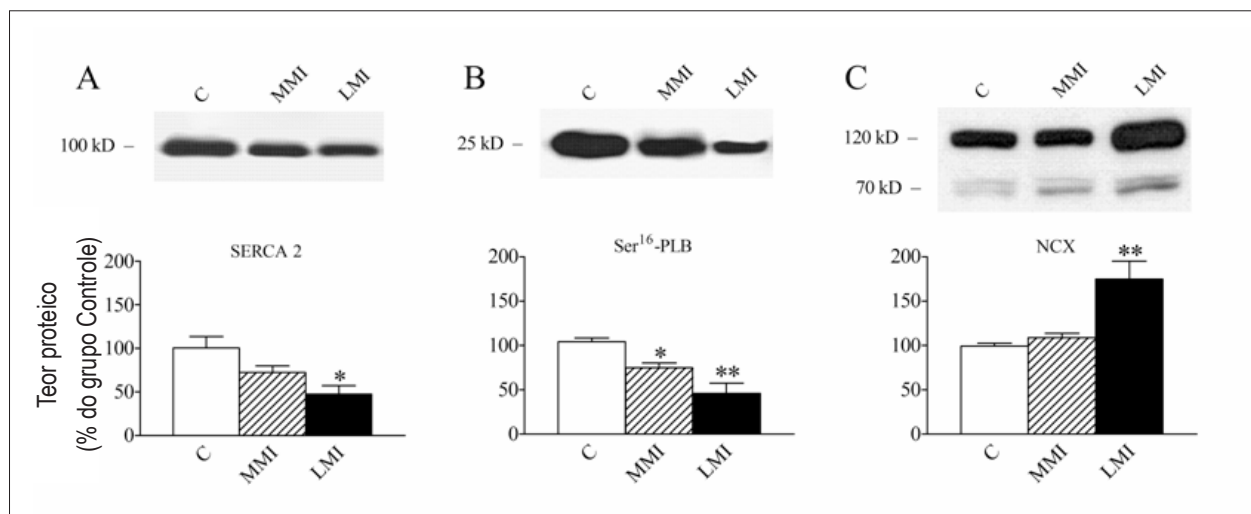


Fig. 3 – Expressão protéica de SERCA2, Ser¹⁶-PLB e NCX por Western blotting. Os teores proteicos de SERCA2 (Painel A) e Ser¹⁶-PLB (Painel B) foram reduzidos em grupos de infarto moderado (MMI, n = 4) e grupos de grande infarto (LMI, n = 4), quando comparados ao grupo controle (C, n = 5); houve superexpressão de NCX (Painel C) apenas no miocárdio do grupo LMI. Os dados (Média ± EPM) são expressos como a porcentagem do grupo controle. *p < 0,05; **p < 0,01 vs. C; e +p < 0,05 vs. MMI. ANOVA bifatorial e teste post hoc de Bonferroni.

no remodelamento pós-IM. Em miocárdios humanos com disfunção, os autores relataram diminuição da potenciação^{32,33} ou depressão²⁸ da contração após pausas prolongadas. Em modelos animais^{9,10}, observou-se a diminuição da potenciação em comparação aos controles a partir de ratos infartados. Além disso, em miócitos sobreviventes após IM em cães, houve redução da potenciação da contração após o repouso³⁴. Essas alterações foram atribuídas essencialmente ao comprometimento da função de armazenamento do RS associado com relativa redução da liberação de Ca²⁺. Recentemente, nosso grupo identificou depressão da CPP nos músculos papilares de ratos com insuficiência cardíaca 40 semanas após a oclusão coronariana¹⁶. No entanto, os mecanismos causais para esse comportamento inédito da CPP em ratos não foram investigados, tendo em vista que o presente estudo utiliza ratos adultos com infartos curados de seis semanas de idade.

Nossos experimentos sugerem que as alterações do acoplamento excitação-contracção contribuem para a redução da CPP nos ratos LMI: a disfunção de armazenamento do RS associada com a intensificação da extrusão de Ca²⁺, uma vez que a Ry aboliu este fenômeno, ao passo que a inibição de NCX normalizou-o.

O comprometimento da função de reabsorção do RS, o que provavelmente ocorre tanto no grupo MMI quanto no grupo LMI, pode não se dar somente pela diminuição da expressão proteica de SERCA2, mas também ao menor teor de Ser¹⁶-PLB como mostra os ensaios de Western blotting. Quando fosforilada, a proteína reguladora PLB alivia a inibição da SERCA2, permitindo a sua função de captação de Ca²⁺. De fato, a diminuição da fosforilação de PLB no miocárdio remodelado de ratos infartados também tem sido descrita como levando à disfunção do RS³¹. Além disso, não podemos ignorar a ocorrência de vazamento diastólico elevado de Ca²⁺ das vesículas do RS. Relata-se que as proteínas reguladoras receptoras da Ry (FKBP, em especial,

FKBP12.6) podem ser patologicamente alteradas em sua estrutura e conteúdo, bem como nos mecanismos de fosforilação que modulam o acoplamento do receptor FKBP-rianodina, resultando em uma subcondutância no remodelamento do miocárdio^{29,35}.

Particularmente nos músculos do grupo LMI, usando Li⁺ em vez de Na⁺ na solução de Krebs-Henseleit, a depressão da CPP em experimentos realizados no grupo LMI passou a se constituir em uma potenciação típica da CPP, sugerindo o papel fundamental do NCX sobre a deficiência da contração subsequente quando ocorre depressão da CPP. Como mencionado anteriormente, embora a acumulação de Ca²⁺ no RS seja relativamente limitada pelo efluxo de Ca²⁺ através do sarcolema, o RS normalmente reabsorve a maior parte do Ca²⁺ como resultado da absorção dominante de SERCA2 sobre a extrusão deste íon pelo sarcolema em cardiomiócitos de ratos. Por outro lado, se os mecanismos de efluxo de Ca²⁺ pelo sarcolema estão desempenhando um papel mais importante do que a reabsorção pelo RS, a depressão do teor de Ca²⁺ pelo RS tende a ocorrer com o prolongamento da pausa em coelhos²⁷. De fato, nos mamíferos em que a importância da SERCA2 é contrabalançada pelo NCX na realização da retirada de Ca²⁺, como é o caso dos coelhos, o miocárdio normalmente exibe essa redução na força da primeira contração seguinte às restantes, proporcionalmente à duração da pausa, designada como depressão pós-reposo¹. De fato, nossos resultados mostram uma superexpressão significativa do teor do NCX no grupo LMI quando comparado aos grupos MMI e C, o que corrobora a ideia que o aumento da atividade e/ou expressão de NCX está relacionado com a depressão pós-reposo após o IM e insuficiência cardíaca, pelo menos nos ratos.

Embora o miocárdio remodelado tanto do grupo MMI quanto do grupo LMI tenha diminuído os teores de SERCA2 e Ser¹⁶-PLB, observou-se elevação do nível de proteína NCX somente no grupo LMI, o grupo experimental que

apresentou depressão pós-reposo. Assim, o perfil molecular com remodelamento pós-IM deve ser uma variável de fundamental importância para a ocorrência de depressão pós-reposo. De fato, as mudanças em diferentes proteínas de cardiomiócitos foram relatadas em modelos animais^{21,30,36} e humanos com insuficiência cardíaca^{37,38} como causadoras do acoplamento disfuncional excitação-contracção. Como resultado, sugerimos que a importância alterada do efluxo de Ca^{2+} pelo sarcolema provocado pela superexpressão de NCX associada com a captação disfuncional por parte do RS tenha, provavelmente, levado ao comprometimento miocárdico dos ratos, apresentando essa depressão da CPP.

Embora não tenhamos medido diretamente o $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ou a atividade das proteínas manipuladoras de cálcio analisadas, limitações reconhecidas no presente estudo, nossos resultados sugerem que o comprometimento da função de reabsorção do RS associado com o aumento de efluxo de cálcio durante a diástole do músculo do grupo LMI é a causa provável da depressão da força pós-reposo. Portanto, é possível especular também que menores índices de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ devido ao aumento de NCX, embora possam reduzir a sobrecarga deletéria de Ca^{2+} , podem diminuir o Ca^{2+} disponível para reabsorção durante a diástole e, conseqüentemente, a quantidade liberada durante a sístole.

Referências

1. Bassani JWM, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol*. 1994;476(2):279-93.
2. Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:23-49.
3. Endoh M. Force-frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance. *Eur J Pharmacol*. 2004;500(1-3):73-86.
4. Ravens U, Link S, Gath J, Noble M. Post-rest potentiation and its decay after inotropic interventions in isolated rat heart muscle. *Pharmacol Toxicol*. 1995;76(1):9-16.
5. Rossoni LV, Xavier FE, Moreira CM, Falcochio D, Amanso AM, Tanoue CU, et al. Ouabain-induced hypertension enhances left ventricular contractility in rats. *Life Sci*. 2006;79(16):1537-45.
6. Abreu G, Vassallo D, Mill J. The $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange mechanism as a regulator of post rest contractions in cardiac muscle. *Braz J Med Biol Res*. 1987;20(6):817-20.
7. Mill J, Vassallo D, Leite C. Mechanisms underlying the genesis of post-rest contractions in cardiac muscle. *Braz J Med Biol Res*. 1992;25(4):399-408.
8. Stefanon I, Martins M, Vassallo D, Mill J. Analysis of right and left ventricular performance of the rat heart with chronic myocardial infarction. *Braz J Med Biol Res*. 1994;27(11):2667-79.
9. Novaes M, Stefanon I, Mill J, Vassallo D. Contractility changes of the right ventricular muscle after chronic myocardial infarction. *Braz J Med Biol Res*. 1996;29(12):1683-90.
10. Wagner KD, Theres H, Born A, Strube S, Wunderlich N, Pfitzer G, et al. Contractile function of papillary muscle from rats with different infarct size after beta-adrenergic blockade and ACE-inhibition. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29(11):2941-51.
11. Portes LA, Tucci PJF. Swim training attenuates myocardial remodeling and the pulmonary congestion in wistar rats with secondary heart failure to myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol*. 2006;87(1):54-9.
12. Gomez AM, Guatimosim S, Dilly KW, Vassort G, Lederer WJ. Heart failure after myocardial infarction: altered excitation-contraction coupling. *Circulation*. 2001;104(6):688-93.
13. Sjaastad I, Birkeland J, Ferrier G, Howlett S, Skomedal T, Bjørnerheim R, et al. Defective excitation-contraction coupling in hearts of rats with congestive heart failure. *Acta Physiol Scand*. 2005;184(1):45-58.
14. O'Rourke B, Kass DA, Tomaselli GF, Kaab S, Tunin, R, Marban E. Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, I: experimental studies. *Circ Res*. 1999;84(5):562-70.
15. Pogwizd SM, Qi M, Yuan W, Samarel AM, Bers DM. Upregulation of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. *Circ Res*. 1999;85(11):1009-19.
16. Helber I, dos Santos AA, Antonio EL, Flumignan RLG, Bocalini, DS, Piccolo C, et al. Digitoxin prolongs survival of female rats with heart failure due to large myocardial infarction. *J Card Fail*. 2009;15(9):798-804.
17. dos Santos L, Antonio EL, Souza AFM, Tucci PJF. Use of afterload hemodynamic stress as a practical method for assessing cardiac performance in rats with heart failure. *Can J Physiol Pharmacol*. 2010;88(7):724-32.
18. dos Santos L, Mello AF, Antonio EL, Tucci PJ. Determination of myocardial infarction size in rats by echocardiography and tetrazolium staining: correlation, agreements, and simplifications. *Braz J Med Biol Res*. 2008;41(3):199-201.
19. Bocalini DS, Veiga ECA, Souza AFM, Levy RF, Tucci PJF. Exercise training-induced enhancement in myocardial mechanics is lost after two-weeks of detraining in rats. *Eur J Appl Physiol*. 2010;109(5):909-14.

Em suma, nossos resultados confirmaram que ratos infartados apresentam disfunção ventricular global e também distúrbios contráteis do miocárdio decorrentes do infarto diretamente relacionado à gravidade do remodelamento. Contribuindo para essa alteração, o uso do protocolo CPP identificou um comportamento excepcional do miocárdio dos ratos, designado como depressão da força pós-reposo. Atribui-se esse fenômeno a um distúrbio nas proteínas de manipulação de Ca^{2+} no exercício das suas funções normais, especialmente em grandes infartos do miocárdio, devido à associação da reduzida reabsorção de Ca^{2+} pela SERCA2 com o efluxo excessivo de Ca^{2+} pelo NCX.

Potencial Conflito de Interesses:

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

Vinculação Acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

Artigo Original

20. Mill J, Novaes M, Galon M, Nogueira J, Vassallo D. Comparison of the contractile performance of the hypertrophied myocardium from spontaneous hypertensive rats and normotensive infarcted rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 1998;76(4):387-94.
21. Smith GL, Allen DG. Effects of metabolic blockade on intracellular calcium concentration in isolated ferret ventricular muscle. *Circ Res*. 1988;62(6):1223-36.
22. Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustín O, et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem*. 2010;401(2):318-20.
23. Litwin SE, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation*. 1994;89(1):345-54.
24. Litwin SE, Litwin CM, Raya T, Warner A, Goldman S. Contractility and stiffness of noninfarcted myocardium after coronary ligation in rats: effects of chronic angiotensin converting enzyme inhibition. *Circulation*. 1991;83(3):1028-37.
25. Wisløff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen O. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2002;54(1):162-74.
26. Zhang X-Q, Song J, Qureshi A, Rothblum LI, Carl LL, Tian Q, et al. Rescue of contractile abnormalities by Na⁺/Ca²⁺ exchanger overexpression in postinfarction rat myocytes. *J Appl Physiol*. 2002;93(6):1925-31.
27. Bassani RA, Bers DM. Na-Ca exchange is required for rest-decay but not for rest-potential of twitches in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1994;26(10):1335-47.
28. Maier LS, Schwan C, Schillinger W, Minami K, Schutt U, Pieske B. Gingerol, isoproterenol and ouabain normalize impaired post-rest behavior but not force-frequency relation in failing human myocardium. *Cardiovasc Res*. 2000;45(4):913-24.
29. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Roseblit N, et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*. 2000;101(4):365-76.
30. Gomez AM, Schwaller B, Porzig H, Vassort G, Niggli E, Egger M. Increased exchange current but normal Ca²⁺ transport via Na⁺-Ca²⁺ exchange during cardiac hypertrophy after myocardial infarction. *Circ Res*. 2002;91(4):323-30.
31. Bers DM. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology*. 2006;21:380-7.
32. Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G. Ca²⁺ handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res*. 1999;85(1):38-46.
33. Rossman EI, Petre RE, Chaudhary KW, Piacentino V, Janssen PML, Gaughan JP, et al. Abnormal frequency-dependent responses represent the pathophysiologic signature of contractile failure in human myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;36(1):33-42.
34. Licata A, Aggarwal R, Robinson RB, Boyden P. Frequency dependent effects on Ca, transients and cell shortening in myocytes that survive in the infarcted heart. *Cardiovasc Res*. 1997;33(2):341-50.
35. Yano M, Yamamoto T, Ikemoto N, Matsuzaki M. Abnormal ryanodine receptor function in heart failure. *Pharmacol Ther*. 2005;107(3):377-91.
36. Wasserstrom JA, Holt E, Sjaastad I, Lunde PK, Odegaard A, Sejersted OM. Altered E-C coupling in rat ventricular myocytes from failing hearts 6 wk after MI. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(2):H798-807.
37. Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Pieske B, Meyer M, Drexler H, et al. Calcium cycling proteins and force-frequency relationship in heart failure. *Basic Res Cardiol*. 1996;91(Suppl.2):17-22.
38. Prestle J, Quinn FR, Smith GL. Ca²⁺-handling proteins and heart failure: novel molecular targets? *Curr Med Chem*. 2003;10(11):967-81.