

Apoptose Miocárdica. Um Novo Mecanismo de Morte Celular

Roberto Vieira Haendchen

Curitiba, PR

Há uma série de cardiopatias e condições clínicas associadas com morte celular e disfunção mecânica ou elétrica do miocárdio, que são inexplicáveis e têm intrigado cardiologistas por um número de décadas. Dentre estas estão achados de morte celular em pacientes com miocardiopatia isquêmica em áreas de suprimento sangüíneo adequado, morte celular em áreas remotas de regiões necrosadas em pacientes com infarto agudo do miocárdio (IAM) e doença uniarterial, morte celular induzida por reperfusão, e morte celular idiopática em pacientes com miocardiopatia dilatada e arritmogênica.

Apoptose, ou morte celular programada, caracteriza-se, biologicamente, por fragmentação cromossômica do DNA, associado a uma série de anormalidades de expressão genética, descrita inicialmente por Kerr e col, em 1972¹. Estes eventos bioquímicos e moleculares são dependentes de energia e, ao contrário da morte celular acidental (ou necrose), ocorrem de forma programada. Apoptose, também, pode ser diferenciada de necrose por alterações típicas celulares, como redução de volume celular e condensação da cromatina nuclear, além de pequenas formações bolhosas na membrana celular. Uma outra diferenciação importante é que necrose costuma ocorrer em regiões miocárdicas mais extensas, ou pelo menos num agrupamento de células, enquanto apoptose pode ocorrer numa única célula ou, seqüencialmente, num número de células. Este processo, assim como a necrose, ocorre em horas. Após apoptose, células são fagocitadas por macrófagos ou sofrem um processo de aglomeração extracelular.

Identificação de apoptose pode ser difícil e exige técnicas histoquímicas para visualização de fragmentos do DNA, que geralmente aparecem em forma escalonada em eletroforese².

Cardiopatias isquêmicas

Há uma discussão na comunidade científica cardiológica que se estende por décadas sobre a indução da necrose no miocárdio reperfundido³⁻⁶, particularmente, na reperfusão em vigência de IAM, o que se acostuma denominar injúria de reperfusão⁷⁻⁹. Além disso, mesmo para aque-

les que têm demonstrado que injúria de reperfusão existe, não se sabe exatamente qual o mecanismo responsável por morte celular induzida por reperfusão⁷⁻⁹. As teorias mais aceitas, atualmente, são aquelas relacionadas com a geração de radicais livres de oxigênio¹⁰⁻¹² e, também, com a ativação de neutrófilos durante a reperfusão¹³⁻¹⁵. Recentemente, foi demonstrado que a reperfusão causa apoptose em coelhos¹⁶. Nesse estudo, grupos distintos de animais foram submetidos a 5 ou 30min de oclusão coronária, seguida de reperfusão por 4h, com grupos controle de 30 ou 270min de isquemia. Sabe-se que em coelhos, um período de 30min de oclusão coronária causa necrose em, aproximadamente, 50% da área de risco, enquanto 210min causa necrose transmural em toda a área isquêmica. Apoptose ocorreu apenas no grupo com 30min de isquemia seguido de reperfusão por 4 horas, não tendo sido observada nos outros grupos, nem mesmo naqueles animais submetidos a 270min de oclusão, onde foi encontrada apenas necrose convencional. No mesmo estudo, foram feitas experiências em animais granulocitopênicos, já que, sabidamente, polimorfonucleares podem sofrer apoptose¹⁷. Confirmou-se, então, que a apoptose ocorreu mesmo em miócitos, os quais apresentaram a fragmentação internucleossômica do DNA, característica da apoptose. Acredita-se que esta fragmentação ocorra por efeito de uma endonuclease específica¹⁸.

Como apoptose é um processo que requer energia, assim como a necrose em faixas de contração, a ocorrência de alguns marcadores típicos para apoptose permitiria a distinção entre estes tipos de lesão. Alguns pesquisadores já têm demonstrado expressão de glicoproteínas ou moléculas de adesão intercelular tipo I (ICAM-1) no miocárdio reperfundido, e não no miocárdio isquêmico, o que indica uma morte celular com utilização energética específica, talvez programada¹⁹. Se este mecanismo é ou não iniciado por formação abrupta de radicais livres pelos próprios polimorfonucleares ativados durante reperfusão, ainda merece esclarecimentos e outros estudos.

Apoptose requer um meio ácido, ou queda do pH celular durante o processo de morte celular. Processos que caracteristicamente inibem a redução do pH celular, como é o caso de condicionamento isquêmico, podem e têm demonstrado uma redução dos possíveis efeitos maléficos da reperfusão²⁰. Este mecanismo protetor do condicionamento isquêmico já tem algumas etapas identificadas; sabe-se que a transdução deste sinal envolve ativação de receptores da adenosina no endotélio (tipos A1 e A3), pelo menos em coelhos²¹, e, provavelmente, também em outros

Hospital Universitário Cajuru - Pontifícia Universidade Católica - Curitiba
Correspondência: Roberto V. Haendchen - Av. São José, 300 - 80050-350 - Curitiba, PR
Recebido para publicação em 16/6/97
Aceito em 23/10/97

mamíferos, transdução esta que prossegue por uma via dependente da proteinoquinase C. Inibidores desta enzima, como a celeritrina, bloqueiam o efeito protetor de preconditionamento isquêmico²².

Se morte celular é prevenível durante o processo de isquemia/reperfusão, este efeito protetor parece depender de um equilíbrio ou situação iônica homeostática, já que reperfusão está associada com alterações iônicas severas, como aumento do cálcio intracelular, que compromete profundamente a função mitocondrial. Além disso, excesso de sódio e acidificação do meio pelo metabolismo anaeróbico são fatores agravantes. O aumento súbito do pH após reperfusão parece ser independente deste influxo excessivo de cálcio, como demonstrado recentemente²³, e é provável que o dano celular durante a reperfusão ocorra por ação específica de certas proteases que agem otimamente em meios com pH mais elevado.

Outro fator complicador na elucidação do processo de dano celular irreversível durante isquemia seguida de reperfusão é o fato de que tanto morte celular accidental (necrose) com morte celular programada (apoptose) podem coexistir nesta situação, o que foi demonstrado em ratos²⁴. Neste estudo foram investigadas as contribuições da necrose accidental e da apoptose na massa necrótica total do ventrículo esquerdo (VE) ao longo de um período de sete dias, em ratos submetidos à oclusão da artéria coronária esquerda.

Considerando a presença de membrana citoplasmática intacta acompanhada de fragmentação da estrutura do DNA, como morte celular apoptótica, e caracterizando necrose através de injeções *in vivo* de antimiosina monoclonal Ab, foi possível diferenciar e quantificar os dois tipos de necrose celular através de coletas seriadas de material ao longo dos sete dias de experimentação. O resultado mais surpreendente da pesquisa foi o fato de que o padrão predominante de dano celular irreversível 2 e 4,5h após oclusão foi de apoptose, e somente após 6h de oclusão coronária é que necrose e apoptose contribuíram, de forma equânime, para a massa ventricular necrosada. Portanto, necrose accidental, predominantemente, se seguiu à apoptose, contrariando o conceito atual de morte celular isquêmica. Aos 20 e 60min pós-occlusão, nenhum dos tipos de morte celular foi observado. Os autores levantam a possibilidade de que apoptose poderia ser desencadeada por um aumento abrupto no nível de cálcio livre intracelular, o que tem sido descrito como um marco de dano celular isquêmico irreversível. Por outro lado, necrose accidental ocorreria mais tardiamente por conta das alterações irreversíveis no sarcolema. Com 2h de oclusão coronária, de um total de 3 milhões de miócitos mortos, 2,8 milhões de células apoptóticas foram encontradas, contrastando com apenas 90.000 miócitos com necrose accidental; esta última atingiu um pico somente 24h após oclusão arterial coronária. Proteínas de superfície celular como o antígeno Fas (que pertence à família do fator de necrose tumoral, TNF) podem mediar a apoptose²⁵, e neste estudo foi demonstrado um aumento de 130 vezes na expressão do Fas em mais de 50% dos

miócitos da área de risco, já aos 120min pós-occlusão coronária. Em animais do grupo controle, isto ocorreu em menos de 1% dos miócitos.

Achados como estes desafiam o nosso conhecimento sobre o aspecto evolutivo da necrose miocárdica em seres humanos, particularmente, porque apoptose já foi demonstrada no homem²⁶⁻²⁷, e não se dispõe ainda de um tratamento eficiente para minimizar a extensão da necrose após IAM. Caso se confirmem estes achados durante isquemia/reperfusão no homem, talvez apoptose possa ser bloqueada através de terapias que inibam o desencadeamento deste processo, que parece se iniciar com a ativação de receptores celulares específicos nos miócitos. Na verdade, a necrose miocárdica (às vezes extensa) observada na prática em pacientes com períodos, relativamente, curtos de oclusão arterial coronária, pode, de fato, ser predominantemente necrose programada, e não morte celular accidental ou necrose isquêmica típica.

Apoptose e dilatação ventricular - Dilatação ventricular, particularmente quando aguda, pode causar morte celular. Nesta situação, quase sempre acompanhada de aumento abrupto da pressão diastólica final do VE, tem sido documentado deslizamento lateral de miócitos²⁸, uma forma de translocação celular intramural, onde células se deslocam radialmente em direção ao epicárdio. Esta translocação parece ser acompanhada de morte celular, sem a qual o deslizamento de grupos celulares não ocorreria. Morte celular nestes casos pode ser mediada, segundo alguns estudos²⁸, por alterações mecânicas intramurais, as quais ativariam genes relacionados à morte apoptótica. Aumento na expressão do Fas também pode ser induzido por dilatação ventricular aguda. Por outro lado, há estudos mostrando diminuição de apoptose com uso de drogas que reduzem o estresse miocárdico, através da liberação local de óxido nítrico²⁸. Além disto, dilatação ventricular causa aumento da produção endógena de superóxido, uma substância tóxica às células e que poderia não apenas causar dano celular, mas também ativar produtos de genes envolvidos no processo de apoptose de miócitos ou de células intersticiais. Apoptose foi recentemente documentada em humanos com insuficiência cardíaca²⁹.

Outra situação que necessita esclarecimento e que tem sido objeto de estudo por cardiologistas-cientistas e motivo de perplexidade por parte de cardiologistas práticos, é a morte celular progressiva e piora clínica, que ocorre em pacientes após dilatação ventricular rápida, seja ela consequência de um infarto extenso ou miocardite aguda, por exemplo. Após cessado o insulto inicial, porquê haveria perda celular progressiva nestes casos? Estudos em cães com insuficiência cardíaca crônica demonstram presença de apoptose³⁰, com uma característica especial: apoptose ocorreu com maior frequência em miócitos circunscritos em áreas com excesso de colágeno. Seria este um fator predisponente à morte celular programada sequencial, levando a uma maior rarefação de miócitos e dilatação ventricular progressiva? Ou excesso de colágeno seria apenas uma conse-

qüência de apoptose miofibrilar múltipla? No momento, não há resposta para estas perguntas, mas elucidação da cascata de eventos que levam à morte celular apoptótica parece ser possível.

Apoptose em ventrículos hipertróficos - Hipertrofia ventricular ocorre em resposta à sobrecarga pressórica crônica, e são bem conhecidos os efeitos da hipertrofia severa sobre a circulação coronária, tanto no que se refere às alterações da reserva vascular coronária quanto à modificação da densidade capilar relativa³¹. Nesta condição, têm sido documentados não só hipertrofia de células musculares cardíacas, mas também alterações intersticiais, como proliferação de colágeno e fibroblastos³². Em paralelo, hipertrofia ventricular severa está associada com morte celular, freqüentemente, atribuída a necrose acidental, devido às alterações já conhecidas no fluxo sanguíneo miocárdico nesta situação. Recentemente, entretanto, morte celular programada, particularmente de miócitos, foi nitidamente demonstrada no miocárdio de ratos submetidos à sobrecarga pressórica crônica³³. Portanto, é possível que a dilatação ventricular e rarefação de miócitos que culminam em insuficiência cardíaca congestiva (ICC) crônica em alguns pacientes com hipertrofia ventricular concêntrica possam ser resultado de morte celular programada (apoptose) seqüencial, e não conseqüência de necrose acidental ocasional.

Apoptose e taquiarritmias - Uma outra situação intrigante é a rarefação de miócitos e presença excessiva de adipócitos no interstício miocárdico em pacientes com “miocardiopatia arritmogênica”, ou displasia ventricular direita. Poderia isto ser resultado de morte celular programa-

da iniciada por taquiarritmias? Apoptose foi claramente documentada em cães submetidos a marcapasso ventricular com freqüência cardíaca elevada³⁴, por um período de quatro semanas, com identificação dos principais achados de morte celular apoptótica. Como esta situação está comumente associada a aumento do estresse diastólico, apoptose poderia resultar desta alteração hemodinâmica, e não freqüência ventricular alta por si. Alterações hemodinâmicas deste tipo causam aceleração da divisão mitótica nuclear e proliferação celular que, em parte, compensam a morte celular apoptótica, como demonstrado recentemente³⁵. Apoptose foi encontrada em pacientes com displasia ventricular direita arritmogênica em estudos recentes³⁶. Miócitos sujeitos a este tipo de estresse sofrem hiperplasia “compensatória”, assim como células intersticiais, fenômenos estes que, associados à apoptose, poderiam levar à ICC crônica. Seria a apoptose de miócitos atriais um mecanismo ou base fisiopatológica da dilatação atrial progressiva, que ocorre em muitos pacientes com fibrilação atrial crônica?

Em resumo, com os conhecimentos atuais, não se pode imputar à necrose acidental, a deteriorização da função cardíaca (ventricular e/ou atrial) observada numa série de cardiopatias, que evolui com ICC progressiva, mesmo porque não há como justificar necrose celular acidental em muitos casos. Investigações mais profundas sobre a ocorrência de apoptose nessas situações, elucidação dos mecanismos responsáveis por morte celular programada, e possíveis intervenções terapêuticas capazes de prevenir morte celular são desafios importantíssimos para cientistas e pesquisadores nas próximas décadas. Ao mesmo tempo, um melhor entendimento desses mecanismos se constituiria numa esperança para portadores de ICC progressiva.

Referências

1. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR - Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-range implications in tissues kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
2. Gavrielli Y, Sherman Y, Bem-Sasson AS - Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501.
3. Jennings RB, Sommers H, Smyth GA, Flock HA, Linn H - Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol Lab Med* 1960; 70: 68-78.
4. Maroko PK, Libby P, Ginks WR et al - Coronary reperfusion. *J Clin Invest* 1972; 51: 2710-6.
5. Lang TW, Corday E, Gold H, Meerbaum S - Consequences of reperfusion after coronary occlusion. *Am J Cardiol* 1974; 33: 69-81.
6. Haendchen RV, Corday E, Torres M, Maurer G, Fishbein M, Meerbaum S - Increased regional end-diastolic wall thickness early after reperfusion: a sign of irreversibly damaged myocardium. *J Am Coll Cardiol* 1984; 3: 1444-53.
7. Braunwald E, Kloner RA - Myocardial reperfusion: A double edged sword? *J Clin Invest* 1985; 76: 1713-9.
8. Nayler WG, Elz JS - Reperfusion injury: laboratory artifact or clinical dilemma? *Circulation* 1986; *Circulation* 74: 215-21.
9. Reperfusion injury after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. Editorial. *Lancet* 1989; I: 655-7.
10. Hearse DJ, Humphrey SM, Bullock GR - The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem? *J Moll Cell Cardiol* 1978; 10: 641-68.
11. McCord JM - Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312: 159-63.
12. Werns SW, Shea MJ, Lucchesi BR - Free radicals in ischemic myocardial injury. *Free Rad Biol Med* 1985; 1: 103-10.
13. Engler RE, Schmid-Schoenheim GW, Pavelee RS - Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Am J Pathol* 1983; 111: 98-111.
14. Engler R, Covell JW - Granulocytes cause reperfusion ventricular dysfunction after 15min of ischemia in the dog. *Circ Res* 1987; 61: 20-8.
15. Litt MR, Jeremy RW, Weisman HF, Winkelstein JA, Becker LC - Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90min of ischemia: evidence or neutrophil-mediated reperfusion injury. *Circulation* 1989; 80: 1816-27.
16. Gottlieb RA, Bureson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL - Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994; 94: 1621-8.
17. Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C - Vitronectin receptor mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 1990; 343: 170-3.
18. Kleine L, Tenniswood M - The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochem Cell Biol* 1990; 68: 1071-4.

19. Kukielka G, Hawkins H, Michael L et al - Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in ischemic and reperfused canine myocardium. *J Clin Invest* 1993; 92: 1504-16.
20. Gottlieb RA, Gruol DL, Zhu JY, Engler RL - Preconditioning in rabbit cardiomyocytes. Role of pH, vacuolar proton ATPase, and apoptosis. *J Clin Invest* 1996; 97: 2391-8.
21. Downey JM, Liu GS, Thornton JD - Adenosine and anti-infarct effects of preconditioning. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 3-8.
22. Steenbergen C, Peralman ME, London RE, Murphy E - Mechanisms of preconditioning: ionic alterations. *Circ Res* 1993; 72: 112-25.
23. Albuquerque CP, Gerstenblith G, Weiss RG - Importance of metabolic inhibition and cellular pH in mediating preconditioning contractile and metabolic effects in rat hearts. *Circ Res* 1994; 74: 139-50.
24. Kajstura J, Cheng W, Reiss K et al - Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996; 74: 86-107.
25. Itoh N, Yonehara S, Ishii A et al - The polypeptide encoded by cDNA for human cell surface antigen FAS can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66: 233-43.
26. Itoh G, Tamura J, Suzuki M - DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1325-31.
27. Rosl F - A simple and rapid method for detection of apoptosis in human cells. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 5243.
28. Cheng W, Li B, Kajstura J et al - Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest* 1995; 96: 2247-59.
29. Olivetti G, Abbi R, Quaini F et al - Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997; 336: 1131-41.
30. Sharov VG, Sabbath HN, Shimoyama H, Goussev AV, Lesch M, Goldstein S - Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am J Pathol* 1996; 148: 141-9.
31. Marcus ML, Mueller TM, Eastham CL - Effects of short-and long-term left ventricular hypertrophy on coronary circulation. *Am J Physiol* 1981; 241: H358-H362.
32. Hamet P, Rochard L, Dam TV et al - Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* 1995; 26: 624-48.
33. Teiger E, Dam TV, Richard L et al - Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest* 1996; 97: 2891-7.
34. Liu Y, Cizola E, Cheng W et al - Myocyte nuclear mitotic division and programmed myocyte cell death characterize the cardiac myopathy induced by rapid ventricular pacing in dogs. *Lab Invest* 1995; 73: 771-87.
35. Quaini F, Cigola E, Lagrasta C, Saccani G, Quaini E, Rossi C - End-stage cardiac failure in humans is coupled with the induction of proliferating cell nuclear antigen and nuclear mitotic division in ventricular myocytes. *Circ Res* 1994; 75: 1050-63.
36. Mallat Z, Tedgui A, Fontaliran F, Frank R, Durigan M, Fontaine G - Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *N Engl J Med* 1996; 335: 1190-6.