

Ações Transmurais Inotrópicas e Antiarrítmicas da Ranolazina em um Modelo Celular da Síndrome do QT Longo Tipo 3

Inotropic and Antiarrhythmic Transmural Actions of Ranolazine in a Cellular Model of Type 3 Long QT Syndrome

Victor Martins Miranda,¹ Samuel Santos Beserra,¹ Danilo Roman-Campos¹

Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Biofísica, Edifício de Ciências Biomédicas,¹ São Paulo, SP - Brasil

Resumo

A Ranolazina (RANO), conhecida na clínica como Ranexa, é um fármaco que previne a arritmia cardíaca através da inibição da corrente de sódio tardia (I_{NaT}). Um gradiente de voltagem transmural do canal Nav1.5 encontra-se na parede ventricular esquerda do coração. Assim, investigamos os efeitos da RANO em cardiomiócitos saudáveis e em modelo celular da Síndrome do QT longo tipo 3 (SQTL tipo 3). Usamos células isoladas do endocárdio (ENDO) e do epicárdio (EPI) e um software de medição com detecção de bordas por vídeo e microscopia de fluorescência para monitorar os transientes de cálcio. A RANO (0,1, 1, 10 e 30 μ M, a 25°C) em uma série de frequências de estimulação teve impacto pouco significativo sobre ambos os tipos de células, mas a RANO (30 μ M) a 35°C minimizou o encurtamento dos sarcômeros em ~21% para células do endocárdio. Em seguida, para simular a SQTL tipo 3, as células do ENDO e EPI foram expostas à toxina ATX-II da anêmona do mar, que aumenta a I_{NaT} . As arritmias celulares induzidas por ATX-II foram suprimidas com o uso da RANO (30 μ M) a 35°C. Com base nesses resultados, podemos concluir que a RANO tem um impacto pouco significativo sobre o encurtamento dos sarcômeros de células saudáveis do ENDO e EPI. Além disso, ela suprime as arritmias induzidas por I_{NaT} para níveis semelhantes nas células do ENDO e EPI.

Introdução

A arritmia nas doenças cardiovasculares é uma das principais causas de morte no mundo todo.¹ A ação antiarrítmica da ranolazina é atribuída à diminuição do componente de inativação lenta da corrente cardíaca interna através do Nav1.5, conhecida como corrente de sódio tardia (I_{NaT}).² Apesar dos avanços importantes na compreensão dos mecanismos celulares subjacentes à ação da RANO, a sua ação transmural nas células musculares do coração permanece incerta. Consequentemente, neste estudo, nossa hipótese é

Palavras-chave

Arritmias, Síndrome do QT Longo do Tipo 3, ATX-II, Ranolazina, Corrente Tardia de Sódio, Contração.

que a RANO desempenha uma ação transmural nas células saudáveis do endocárdio (ENDO) e epicárdio (EPI) estimuladas por região, bem como nas arritmias e perturbação do cálcio induzidas pela toxina de anêmona (ATX-II),³ que aumenta a I_{NaT} e simula vários aspectos da Síndrome do QT longo tipo 3 (SQTL tipo 3), uma doença relacionada ao aumento da I_{NaT} nas células do coração.²

Métodos

Animais

Foram usados ratos Wistar machos (160-250 g; com 5 a 7 semanas de vida) nos experimentos. Todos os procedimentos experimentais foram realizados conforme as diretrizes institucionais, e o estudo foi aprovado pelo Comitê de revisão ética local. Os cardiomiócitos foram isolados conforme descrito anteriormente.⁴

O encurtamento do sarcômero e o transiente de cálcio

Os experimentos foram conduzidos como descrito anteriormente pelo nosso grupo.⁵ As células foram perfundidas com RANO (Alomone, Israel) a 0,1, 1, 10, ou 30 μ M a partir de uma solução stock de 10 mM. Os dados foram normalizados como a função de contração do sarcômero antes da exposição à RANO. Para acessar o efeito antiarrítmico da RANO após exposição ao ATX-II (6 nM) (Alomone, Israel), os tempos para 90% de relaxamento do sarcômero (T90R) e recaptção de cálcio (T90Ca²⁺) foram registrados como índices arrítmicos. Adicionalmente, 10 mM de Tetrodotoxina (TTX) (Alomone, Israel) foi utilizado para confirmar que o fenótipo observado era de fato decorrente da I_{NaT} .

Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Diferenças significativas foram determinadas usando o teste de T não pareado de duas amostras ou ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguidos de análises post-hoc (Teste de Tukey). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os cardiomiócitos de pelo menos dois corações diferentes foram usados em cada experimento.

Resultados e Discussão

Estudos anteriores demonstraram que os cardiomiócitos saudáveis apresentam I_{NaT} .⁶ Além disso, um gradiente de corrente de sódio foi registrado na parede ventricular esquerda

Correspondência: Danilo Roman Campos •

Universidade Federal de São Paulo – Biofísica - Rua Botucatu, 862. CEP 04023-062, São Paulo, SP – Brasil

E-mail: drcbio@gmail.com

Artigo recebido em 03/04/2019, revisado em 19/08/2019, aceito em 10/09/2019

DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20190220>

que, conforme vem sendo relatado, é maior nas células do ENDO no que nas células do EPI.⁷ Desse modo, levantamos a hipótese de que as células do ENDO apresentam maior I_{NaT} quando comparadas com as células do EPI. Uma vez que a I_{NaT} modula o $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos,⁸ a RANO seria capaz de minimizar a contração em ambos os grupos celulares, porém com maior potência nas células do ENDO e EPI. Para testar essas hipóteses, as células foram perfundidas a 25°C com RANO; Entretanto, a RANO não foi capaz de minimizar o encurtamento do sarcômero nos cardiomiócitos do ENDO e do EPI (Figuras 1A e C). Uma tendência semelhante foi observada quando os cardiomiócitos foram expostos à RANO (30 μ M) e estimulados a 0,2 Hz. Quando as células do ENDO e EPI foram expostas à RANO (30 μ M) e estimuladas a 0,2 Hz, usando uma solução de perfusão a 35°C, o encurtamento do sarcômero foi reduzido nas células do ENDO em ~21% ($p < 0.05$), mas não nas células do EPI (Figuras 1B e D). Desse modo, corroborando os achados anteriores, nossos resultados sugerem que as células saudáveis do ENDO de fato apresentam maior I_{NaT} do que as células do EPI. Entretanto, também é importante observar que a RANO

(30 μ M) também poderia bloquear a corrente de cálcio tipo L nos cardiomiócitos.⁹

Para melhor compreensão do mecanismo subjacente ao encurtamento do sarcômero induzido por RANO, experimentos posteriores foram realizados a 35°C. Os cardiomiócitos foram carregados com Fura-2/AM para monitorar a oscilação de cálcio durante a contração celular, e as células foram expostas à ATX-II para aumentar a I_{NaT} e induzir um fenótipo de SQT tipo 33 (Figura 2). As células do ENDO (Figuras 2A, B e C) e do EPI (Figuras 2D, E e F) expostas ao ATX-II mostraram evidentes perturbações do cálcio e arritmias mecânicas simultâneas. A RANO (30 μ M) minimizou expressivamente o fenótipo arritmico induzido por ATX-II em ambos os grupos celulares para extensões similares. Para confirmar que o fenótipo arritmico observado nos nossos experimentos foram realmente atribuídos à I_{NaT} as células foram expostas ao ATX-II (6 nM) [Figura 2A (iv) e Figura 2D (iv)], após exposição a 10 μ M de TTX e ATX-II (6 nM) [Figura 2A (v) e Figura 2D (v)]. Os resultados confirmaram que o fenótipo arritmico observado foi decorrente do incremento da I_{NaT} . Apesar de as células do ENDO dos ratos ter apresentado

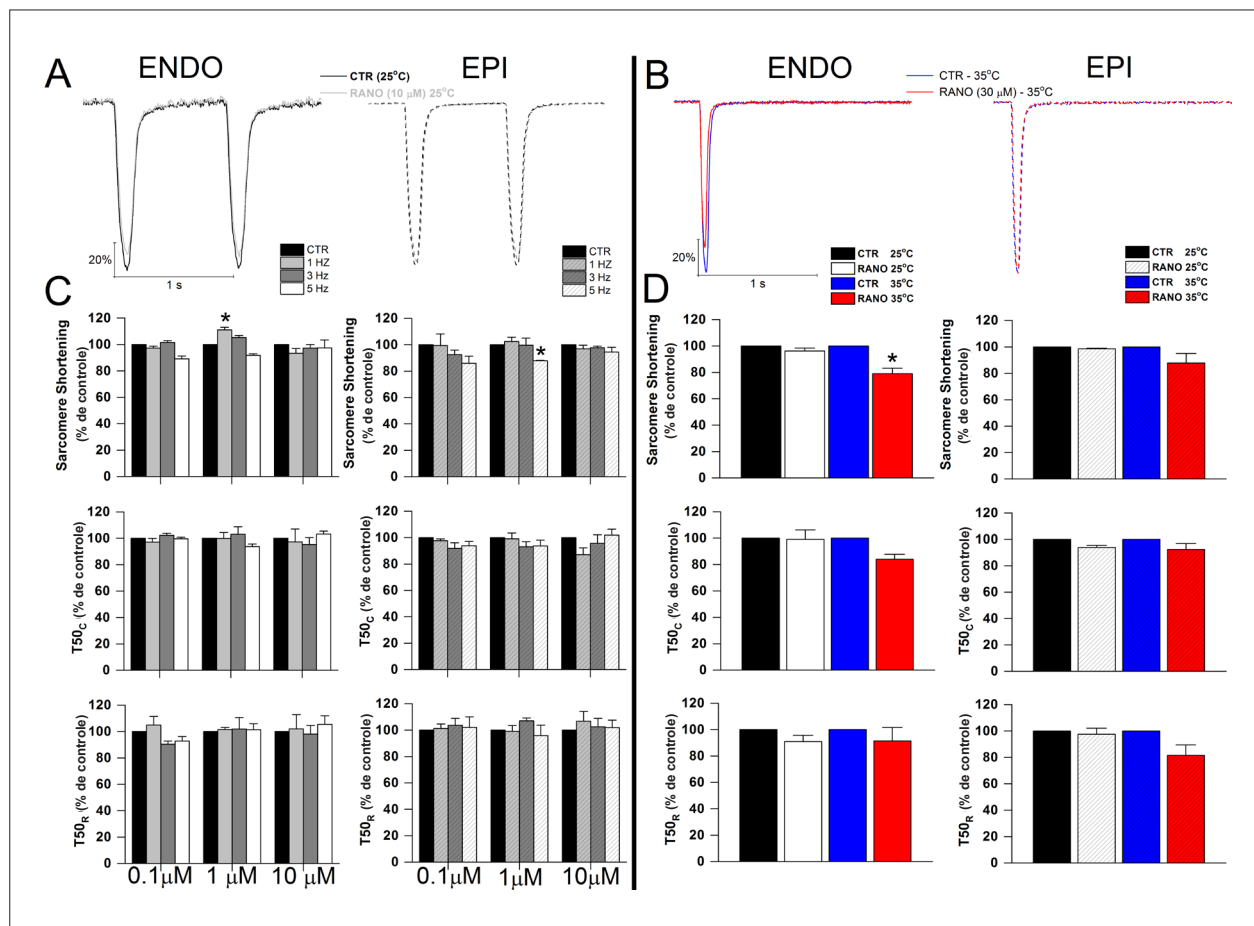


Figura 1 – Efeito Inotrópico da ranolazina (RANO) sobre o encurtamento do sarcômero dos cardiomiócitos do ENDO e EPI. Registros característicos de encurtamento do sarcômero antes (preto (25°C) e azul (35°C)) e após (cinza claro (25°C) e vermelho (35°C)) exposição do cardiomiócito do ENDO (esquerda) e EPI (direita) à RANO ((A) 10 and (B) 30 μ M). Efeito inotrópico da RANO (0,1, 1, e 10 μ M) (C) e 30 μ M (D) sobre o encurtamento do sarcômero (barras superiores); tempo normalizado de contração do sarcômero para 50% (T50c) (barras do meio) e; tempo normalizado de relaxamento do sarcômero para 50% (T50r) (barras inferiores). As barras tracejadas representam as células do EPI ($n = 3-6$ células/concentração). * $p < 0,05$, na comparação antes e depois de exposição à RANO.

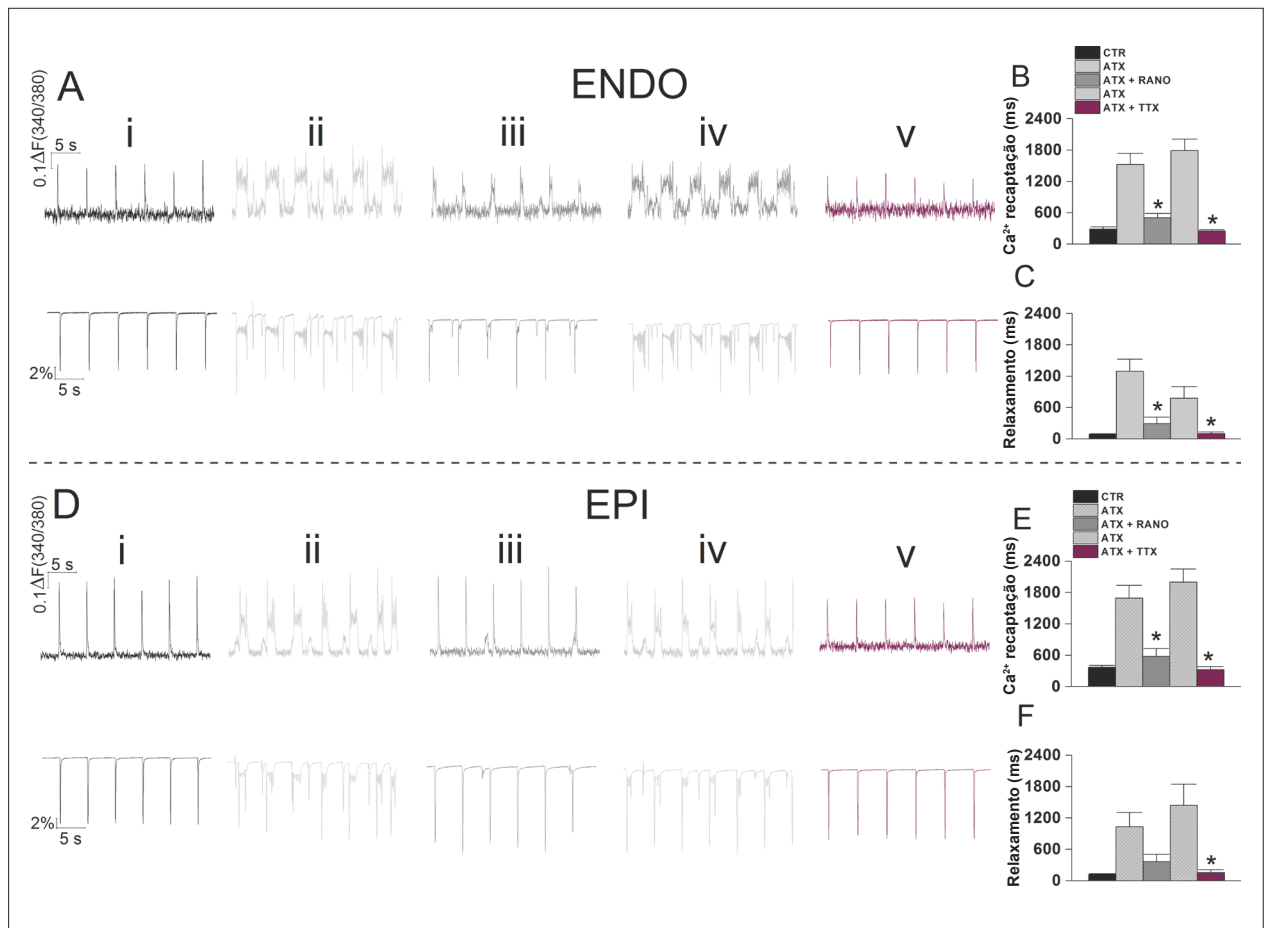


Figura 2 – Ação da ranolazina (RANO) nos cardiomiócitos do ENDO e EPI expostos ao ATX-II e estimulados a 0,2 Hz. Traços característicos de transientes de cálcio (traços superiores) e encurtamento dos sarcômeros dos cardiomiócitos (traços inferiores) após contato com solução de Tyrode (i), ATX-II (6 nM) (ii), ATX-II (6 nM) + RANO (30 μM) (iii), ATX-II (6 nM) (iv), e ATX-II (6 nM) + TTX (10 μM) (v) nas células do ENDO (A) e EPI (D). Tempo para 90% de reuptação de Ca²⁺ nas células do ENDO (n = 8 células) (B) e EPI (n = 6 células) (E). Tempo para 90% de relaxamento do sarcômero nas células do ENDO (C) e EPI (F). * p < 0,05, quando comparado com o grupo ATX-II.

maiores correntes de sódio em relação às células do EPI,^{7,10} o fenótipo arritmico induzido por ATX-II e a extensão dos efeitos antiarrítmicos da Raneza foram semelhantes em ambos os grupos celulares.

Curiosamente, o intervalo de concentração terapêutica da RANO é de 1–10 μM.¹¹ A aparente discrepância no potencial da RANO pode ser explicada pelo fato de que o ATX-II nas doses de 1–10 nM induz maior I_{NaT} nos cardiomiócitos do que aquele observado nas doenças cardiovasculares.^{3,6}

Conclusão

A RANO exerceu pouca influência sobre o encurtamento do sarcômero de cardiomiócitos saudáveis e suprimiu as arritmias induzidas por I_{NaT} a extensões semelhantes nas células do ENDO e EPI.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa e Redação do manuscrito: Campos DR; Obtenção de dados: Miranda

VM, Beserra SS; Análise e interpretação dos dados e Análise estatística: Miranda VM, Campos DR.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPESP nº 2014/09861-1.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Victor Martins de Miranda pela Universidade Federal de São Paulo.

Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do CEUA UNIFESP sob o número de protocolo 2435/70816. Todos os procedimentos envolvidos nesse estudo estão de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, atualizada em 2013.

Errata

Na Comunicação Breve "Ações Transmurais Inotrópicas e Antiarrítmicas da Ranolazina em um Modelo Celular da Síndrome do QT Longo Tipo 3", páginas 732-735, dos autores Victor Martins Miranda, Samuel Santos Beserra, Danilo Roman Campos, considerar correta a grafia Danilo Roman-Campos para o nome do autor Danilo Roman Campos.

Referências

1. Deo R, Albert CM. Epidemiology and genetics of sudden cardiac death. *Circulation*. 2012;125(4):620-37.
2. Bohnen MS, Peng C, Robey SH, Terrenoire C, Iyer V, Sampson KJ, et al. Molecular pathophysiology of congenital long QT syndrome. *Physiol Rev*. 2017;97(1):89-134.
3. Clark RB, Giles WR. Current-voltage relationship for late Na(+) current in adult rat ventricular myocytes. *Curr Top Membr*. 2016;78:451-78.
4. Santos-Miranda A, Cruz JS, Roman-Campos D: Electrical properties of isolated cardiomyocytes in a rat model of thiamine deficiency. *Arq Bras Cardiol*. 2015;104(3):242-5.
5. Santos MS, Oliveira ED, Santos-Miranda A, Cruz JS, Gondim ANS, Menezes-Filho JER, et al. Dissection of the effects of quercetin on mouse myocardium. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2017;120(6):550-9.
6. Iyer V, Roman-Campos D, Sampson KJ, Kang G, Fishman GI, Kass RS. Purkinje cells as sources of arrhythmias in long QT syndrome type 3. *Sci Rep*. 2015 Aug 20;5:13287.
7. Rosati B, Grau F, McKinnon D. Regional variation in mRNA transcript abundance within the ventricular wall. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;40(2):295-302.
8. Fraser H, Belardinelli L, Wang L, Light PE, McVeigh JJ, Clanachan AS: Ranolazine decreases diastolic calcium accumulation caused by ATX-II or ischemia in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41(6):1031-8.
9. Allen TJ, Chapman RA. Effects of ranolazine on L-type calcium channel currents in guinea-pig single ventricular myocytes. *Br J Pharmacol*. 1996;118(2):249-54.
10. Honen BN, Saint DA: Heterogeneity of the properties of INa in epicardial and endocardial cells of rat ventricle. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29(3):161-6.
11. Chaitman BR, Skettino SL, Parker JO, Hanley P, Meluzin J, Kuch J, et al. Anti-ischemic effects and long-term survival during ranolazine monotherapy in patients with chronic severe angina. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(8):1375-82.

