

Estresse Crônico Melhora a Função Miocárdica sem Alterar a Atividade do Canal-L para Ca^{2+} em Ratos

Chronic Stress Improves the Myocardial Function without Altering L-type Ca^{2+} Channel Activity in Rats

Thiago Bruder-Nascimento^{1,2}, Dijon Henrique Salome Campos³, André Soares Leopoldo⁴, Ana Paula Lima-Leopoldo⁴, Katashi Okoshi³, Sandra Cordellini¹, Antônio Carlos Cicogna³

Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, Universidade do Estado de São Paulo (UNESP)¹, Botucatu, SP; Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP)², Ribeirão Preto, SP; Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade do Estado de São Paulo (UNESP)³, Botucatu, SP; Departamento de Esportes, Centro de Educação Física e Esportes, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)⁴, Vitória, ES – Brasil

Resumo

Fundamento: O estresse crônico está associado à remodelação cardíaca; entretanto, os mecanismos permanecem a ser descobertos.

Objetivo: A proposta deste estudo foi testar a hipótese de que o estresse crônico promove disfunção cardíaca associada a depressão da atividade do canal-L para Ca^{2+} .

Métodos: Ratos Wistar machos com 30 dias de idade (70 - 100 g) foram distribuídos dentro de dois grupos: controle (C) e estresse crônico (St). O estresse consistiu na imobilização durante 15 semanas, cinco vezes por semana, 1 h por dia. A função cardíaca foi avaliada pela performance do ventrículo esquerdo por meio do ecocardiograma e pelo músculo papilar ventricular isolado. A função do músculo papilar foi avaliada em condição basal e com manobras inotrópicas, como: pós-pausa e elevação na concentração extracelular de Ca^{2+} , na presença ou ausência de um bloqueador específico de canal-L para Ca^{2+} .

Resultados: O estresse ficou caracterizado por hipertrofia das glândulas adrenais, aumento nos níveis de corticosterona circulante e por hipertensão arterial. Ainda, o estresse crônico gerou hipertrofia ventricular esquerda. O estresse crônico foi capaz de melhorar a resposta na contração do músculo papilar para manobras inotrópicas positivas. A melhora de função não esteve associada com o canal-L para Ca^{2+} .

Conclusão: O estresse produziu hipertrofia cardíaca; entretanto, nos estudos de músculo papilar isolado, as manobras inotrópicas positivas potencializaram a função cardíaca em ratos estressados, sem o envolvimento do canal-L para Ca^{2+} . Assim os mecanismos responsáveis permanecem incertos para alterações no influxo de Ca^{2+} . (Arq Bras Cardiol 2012;99(4):907-914)

Palavras-chave: Estresse fisiológico / complicações; estresse fisiológico / fisiologia; doenças cardiovasculares / psicologia; ratos; músculos papilares.

Abstract

Background: Chronic stress is associated with cardiac remodeling; however the mechanisms have yet to be clarified.

Objective: The purpose of this study was test the hypothesis that chronic stress promotes cardiac dysfunction associated to L-type calcium Ca^{2+} channel activity depression.

Methods: Thirty-day-old male Wistar rats (70 - 100 g) were distributed into two groups: control (C) and chronic stress (St). The stress was consistently maintained at immobilization during 15 weeks, 5 times per week, 1h per day. The cardiac function was evaluated by left ventricular performance through echocardiography and by ventricular isolated papillary muscle. The myocardial papillary muscle activity was assessed at baseline conditions and with inotropic maneuvers such as: post-rest contraction and increases in extracellular Ca^{2+} concentration, in presence or absence of specific blockers L-type calcium channels.

Results: The stress was characterized for adrenal glands hypertrophy, increase of systemic corticosterone level and arterial hypertension. The chronic stress provided left ventricular hypertrophy. The left ventricular and baseline myocardial function did not change with chronic stress. However, it improved the response of the papillary muscle in relation to positive inotropic stimulation. This function improvement was not associated with the L-type Ca^{2+} channel.

Conclusion: Chronic stress produced cardiac hypertrophy; however, in the study of papillary muscle, the positive inotropic maneuvers potentiated cardiac function in stressed rats, without involvement of L-type Ca^{2+} channel. Thus, the responsible mechanisms remain unclear with respect to Ca^{2+} influx alterations. (Arq Bras Cardiol 2012;99(4):907-914)

Keywords: Stress, physiological / complications; stress, physiological / physiopathology; cardiovascular diseases / psychology; rats; papillary muscles.

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

Correspondência: Thiago Bruder do Nascimento •

Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP - Brasil

E-mail: bruderthiago@usp.br, bruderthiago@yahoo.com.br

Artigo recebido em 27/02/12; revisado em 01/03/12; aceito em 16/04/12.

Introdução

O estresse tem um papel essencial em nosso dia a dia, e muitas vezes está relacionado a problemas conjugais, de saúde, trabalho e baixa condição socioeconômica¹. Selye² definiu o estresse como um estado caracterizado por um padrão de resposta uniforme, independentemente do estressor particular, que pode levar a alterações patológicas de longo prazo, tais como: ansiedade crônica, depressão, obesidade, distúrbios imunológicos, inflamação, resistência a insulina e doença cardiovascular^{3,4}.

Os transtornos cardiovasculares mais bem definidos, relacionados ao estresse crônico em seres humanos, são hipertensão arterial, variabilidade da frequência cardíaca, disfunção diastólica e sistólica ventricular esquerda e alterações vasculares⁵⁻⁸. Além disso, esse estresse variável durante 15 dias foi capaz de produzir hipertrofia cardíaca e mudanças estruturais cardíacas permanentes⁹. Zhao e cols.¹⁰ também mostraram que a submissão de ratos a estresse crônico de imobilização durante 21 dias resultou em disfunção cardíaca e lesão estrutural do coração.

Além disso, experimentos realizados em ratos submetidos a estresse emocional demonstraram aumento na contração e velocidade de relaxamento dos músculos papilares isolados¹¹. Meerson e cols.¹² observaram como a adaptação a estresses de curto prazo do músculo papilar e coração de ratos isolados aumentou a resistência do miocárdio aos efeitos arritmogênico e contrátil do excesso de Ca^{2+} .

Além disso, ratos submetidos a estresse crônico de imobilização durante sete dias, duas horas por dia, mostraram aumento dos receptores inositol-1,4,5-trifosfato tipo 1 e 2 nos ventrículos esquerdos¹³. Em experimentos com ratos, com modelo de estresse de imobilização de 21 dias, Zhao e cols.¹⁴ determinaram que o estresse aumenta a expressão da subunidade $\alpha 1c$ do canal de cálcio tipo L, e corrente de cálcio em miócitos ventriculares dos ratos.

O canal de cálcio tipo L desempenha um papel importante na manutenção da função cardíaca normal. O influxo de íons Ca^{2+} através do canal de cálcio tipo L é crucial para o acoplamento excitação-contração no coração¹⁵. As alterações na densidade ou papel do canal de cálcio tipo L têm sido implicadas numa variedade de doenças cardiovasculares^{16,17}.

Perante essa informação, o objetivo foi testar a hipótese de que o estresse crônico promove a disfunção cardíaca associada com a diminuição da atividade do canal Ca^{2+} tipo L. Uma das características novas do presente estudo é o tempo em que os ratos foram submetidos a estresse, 15 semanas, considerando-se que há uma falta de estudos que avaliam o estresse crônico por períodos prolongados, com parâmetros que englobam estrutura cardíaca e atividade. Este estudo contribuirá para a compreensão das alterações cardíacas provocadas pelo estresse crônico.

Materiais E Métodos

Cuidado dos animais

Ratos Wistar machos de 30 dias de idade (70 - 100 g), provenientes do Centro de Animais da Faculdade de

Medicina de Botucatu (Botucatu, São Paulo, Brasil) foram alojados em gaiolas individuais. O ambiente foi controlado em termos de luz (ciclo de 12 h luz/escurecimento começando às 6 h da manhã), ar limpo a temperatura ambiente ($23 \pm 3^{\circ}C$) e umidade relativa ($60 \pm 5\%$). Após sete dias de aclimação, os ratos foram distribuídos em dois grupos: controle (C, n = 8) e estresse crônico (St, n = 8). Os animais foram pesados semanalmente. Todos os experimentos e os procedimentos foram realizados de acordo com o Guia para Uso e Cuidado de Animais de Laboratório publicado pelo Conselho Nacional de Pesquisa e foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Biociências da Unesp-Botucatu (Protocolo nº 95/08-CEEA).

Estresse crônico

Após 30 dias, os membros do grupo St foram imobilizados individualmente em cápsulas de metal à temperatura ambiente de $25^{\circ}C$, uma hora por dia, cinco dias por semana, durante 15 semanas. Durante a sessão de estresse, o grupo C permaneceu na sua gaiola respectiva à temperatura ambiente de $25^{\circ}C$, sem receber comida nem água. No final da sessão, o grupo St foi reintroduzido na gaiola original.

Perfil nutricional

A Ingestão semanal de Calorias (IC) foi calculada pelo consumo médio semanal de alimentos x densidade energética da dieta. A Eficiência Alimentar (EA), a capacidade de transformar as calorias consumidas em Peso Vivo (PV), foi determinada seguindo a fórmula: média de ganho de peso corporal (g)/consumo total de calorias (kcal).

Comorbidades associadas com o estresse crônico

Levando em conta que o estresse crônico pode desenvolver algumas comorbidades, como hipertensão arterial e hipercorticonemia, as seguintes avaliações foram realizadas em todos os grupos. Os animais foram sacrificados e a hipertrofia das glândulas adrenais foi avaliada. As glândulas foram removidas, dissecadas e pesadas.

Pressão arterial sistólica (PAS)

A PAS foi avaliada de três em três semanas durante as 15 semanas. A avaliação foi pelo método não invasivo de manguito de cauda, com Eletroesfigmomanômetro Narco® BioSystems (International Biomedical, Austin, TX, EUA). Para cada animal, foi registrada a média de duas leituras de pressão.

Nível de corticosterona

No final do período experimental, os animais foram submetidos a 12-15 horas de jejum, anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg ip), e sacrificados por decapitação. As amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados, e o soro foi separado por centrifugação a $3000 \times g$ durante 15 minutos a $4^{\circ}C$ e armazenado a $-80^{\circ}C$ até a análise posterior. Os níveis de corticosterona foram determinados por radioensaio usando o kit específico (Coat-A-Count Rat Corticosterone – Diagnostic Products Corporation).

Ecocardiografia

Os ratos foram pesados e anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilazina (1 mg/kg), administrados por via intramuscular.

Os animais foram colocados em posição de decúbito lateral esquerdo para a ecocardiografia, a qual foi realizada com máquina de ultrassom HDI 5000 Phillips, equipado com transdutor eletrônico de 12 MHz. Para medir as estruturas do coração, foram obtidas imagens em modo monodimensional (modo M), com imagens em modo bidimensional orientando o feixe de ultrassom, e o transdutor colocado numa posição paraesternal no eixo curto. A imagem do Ventrículo Esquerdo (VE) foi obtida posicionando o cursor em modo M logo abaixo do plano da valva mitral no nível dos músculos papilares. As imagens da aorta e do átrio esquerdo foram obtidas com o cursor em modo-M posicionado no nível da valva aórtica. As imagens foram registradas em impressora Sony Co. UP-890. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas manualmente, com um paquímetro de precisão.

Quando o diâmetro da cavidade ventricular era máximo, foram medidos: o Diâmetro Diastólico do VE (DDVE), a Espessura Diastólica da Parede Posterior do VE (EDPPVE) e a Espessura Diastólica do Septo Interventricular (EDSIV). Quando o diâmetro da cavidade era mínimo, foram medidos: o Diâmetro Sistólico do VE (DSVE), a Espessura Sistólica da Parede Posterior do VE (ESPPVE) e a Espessura Sistólica do Septo Interventricular (ESSIV). O Átrio Esquerdo (AE) foi medido em seu diâmetro máximo. A Massa de VE (MVE) foi calculada usando a seguinte fórmula: $MVE = [(DDVE + EDPPVE + EDSIV)^3 - (DDVE)^3] \times 1,04$. As seguintes variáveis foram derivadas das dimensões descritas: A espessura relativa do VE (EDPPVE/DDVE), DDVE/PC, AE/MC e o Índice de MVE (IMVE, MVE/MC).

A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: porcentagem de encurtamento mesocárdico (% Enc. Meso.): $[(DDVE + \frac{1}{2} EDPPVE + \frac{1}{2} EDSIV) - (DSVE + \frac{1}{2} ESPPVE + \frac{1}{2} ESSIV)] / (DDVE + \frac{1}{2} EDPPVE + \frac{1}{2} EDSIV)$, porcentagem de encurtamento endocárdico (% Enc. Endo.): $[(DDVE - DSVE) / DDVE]$; velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP). A função diastólica foi avaliada pela razão entre o pico da velocidade de influxo inicial (onda E) e a contração atrial (onda A) do fluxo transmitral (E/A), o tempo de desaceleração da onda E (TDE) e o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRI). Após a eutanásia, os átrios (A), o ventrículo direito (VD) e o VE foram pesados em valores absolutos e corrigidos pelo PC.

Função miocárdica

O papel do miocárdio foi avaliado mediante o estudo de músculos papilares isolados do VE. Essa preparação nos permite medir a capacidade do músculo cardíaco para encurtar-se e exercer força, independentemente de influências que possam modificar o desempenho mecânico *in vivo* do miocárdio, como frequência cardíaca, pré e pós-carga. Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg ip) e sacrificados por decapitação. Os corações foram removidos e colocados em solução oxigenada de Krebs-Henseleit a 28°C. Os músculos papilares do VE foram dissecados, montado entre dois cliques de mola, e colocados numa câmara contendo

solução de Krebs-Henseleit (118,5 mM de NaCl; 4,69 mM de KCl, 2,5 mM de CaCl₂; 1,16 mM MgSO₄; 1,18 mM de KH₂PO₄; 5,50 mM GL, e 24,88 mM NaCO₃) mantida a 28 °C com circulador de água termostaticado. A solução do banho foi borbulhada com oxigênio 95% e dióxido de carbono 5%, com um pH de 7,4. O clipe de mola inferior foi ligado a um transdutor de força 120T-20B (Kyowa, Tóquio, Japão) por um fio de aço fino (1/15.000 polegada). O clipe de mola superior foi ligado por um fio de aço fino a um braço de alavanca rígido, acima do qual foi montado um parafuso micrométrico para ajuste do comprimento do músculo. A preparação do músculo foi colocada entre dois eletrodos de platina (Grass E8, GRASS Technologies, An Astro-Med, Inc. Product Group, West Warwick, RI, EUA) e estimulada a uma frequência de 0,2 Hz (12 pulsos/min) usando pulsos de onda quadrada de 5 ms de duração.

Os músculos foram contraídos isotonicamente com cargas leves por 60 min, e em seguida carregados (50 g) para contrair isometricamente e esticar até ao máximo das curvas comprimento-tensão. Após um período de 5 min, durante o qual as preparações foram submetidas a contrações isotônicas, os músculos foram novamente colocadas sob condições isométricas, e o pico da curva de comprimento-tensão (L_{max}) foi cuidadosamente determinado. Um período de 15 min de contração isométrica estável foi imposto antes do período experimental, durante o qual uma contração isométrica foi, então, registrada. Os parâmetros mecânicos convencionais em L_{max} foram calculados a partir da contração isométrica: tensão máxima desenvolvida normalizada por área de seção transversal (DT [g/mm²]), o pico positivo (+dT/dt [g/mm²/s]) e negativo (-dT/dt [g/mm²/s]) das derivadas da tensão normalizada por área transversal.

Os músculos papilares foram avaliados em condição basal de 2,5 mM Ca²⁺ e depois de manobras inotrópicas e lusitrópicas: aumentos na concentração de Ca²⁺ extracelular e contração pós-reposo (CPR). As respostas inotrópicas foram registradas 5 min após a adição de cada concentração de Ca²⁺ extracelular na solução do banho. A CPR foi estudada em uma concentração de Ca²⁺ extracelular de 0,5 mM, onde o estímulo foi interrompido por 10, 30, e 60 s antes de reiniciar a estimulação. Durante o repouso no miocárdio do rato, o RS acumula Ca²⁺ acima e além do acumulado durante a estimulação regular, e a primeira batida após o intervalo de repouso (B1) é mais forte que a batida antes do intervalo de repouso (B0).

A avaliação da atividade do canal de Ca²⁺ tipo L foi realizada utilizando um inibidor específico, o cloridrato de diltiazem (10⁻⁴ M), em presença de concentrações acumulativas Ca²⁺. Vinte minutos após a adição de diltiazem na solução, cada concentração de Ca²⁺ foi separadamente adicionada à solução do banho durante 10 min, e a atividade do músculo foi avaliada.

No final do estudo, os parâmetros utilizados para caracterizar o músculo papilar foram comprimento (mm), peso (mg), e área de secção transversal área de secção transversal AST (mm²). A AST foi calculada a partir do comprimento e do peso do músculo papilar, assumindo uniformidade e gravidade específica de 1.0. O comprimento do músculo em L_{max} foi medido com um catetômetro (Gartner Scientific Corporation, Chicago, IL, EUA), e o músculo entre os dois cliques foi secado com papel absorvente e pesado.

Análise estatística

Os dados foram relatados como média \pm desvio padrão. As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando o teste *t* de Student para amostras independentes. O peso corporal e a pressão arterial entre os grupos foram comparados por análise de variância (ANOVA) para medições repetidas. Quando foram encontradas diferenças significativas ($p \leq 0,05$), o teste *post hoc* de Bonferroni para comparações múltiplas foi aplicado. As manobras do estudo do músculo papilar foram analisadas com a análise de variância de dois fatores para medidas repetidas (ANOVA), e complementada pelo teste de *post hoc* Tukey para diferenças específicas. A comparação dos valores de contração pós-reposo foi realizada utilizando o teste *t* de Student. O nível de significância considerado foi de 5%.

Resultados

Peso corporal, alimentação e ingestão de calorias em relação aos níveis de corticosterona e pressão arterial

O estresse crônico não alterou o peso corporal ($C = 438 \pm 49$ vs. $St = 421 \pm 33$, $p > 0,05$), enquanto a IC ($C = 68,7 \pm 5,1$ vs. $St = 69,2 \pm 8,6$, $p > 0,05$) e a EA ($C = 2,24 \pm 0,25$ vs. $St = 2,25 \pm 0,32$, $p > 0,05$) aumentaram o nível de corticosterona [$C = 59,32 \pm 19,2$ vs. $St = 98,02 \pm 23,0$, $p \leq 0,05$] e a massa das glândula adrenais [$C = 0,57 \pm 0,09$ vs. $St = 0,73 \pm 0,08$, $p \leq 0,05$]. A tensão aumentou a pressão arterial após três semanas de exposição; esse aumento persistiu até ao final do protocolo experimental (Figura 1).

Estudo morfológico *post-mortem*

No estudo *post-mortem*, o estresse crônico estimulou aumento da relação VE/PC ($C = 1,71 \pm 0,24$ vs. $St = 1,86 \pm 0,37$, $p \leq 0,05$). Inversamente, não houve diferença entre os grupos em outras variáveis: relação TA/PC ($C = 0,19 \pm 0,04$ vs. $St = 0,18 \pm 0,02$, $p > 0,05$) e razão VD/PC ($C = 0,56 \pm 0,97$ vs. $St = 0,57 \pm 0,84$, $p > 0,05$).

Estudo ecocardiográfico

A Tabela 1 mostra o estudo da estrutura cardíaca analisada por ecocardiografia. O grupo St teve aumento no índice de massa do ventrículo esquerdo. No entanto, em outras variáveis, não houve diferenças significativas entre os grupos. Em relação aos parâmetros funcionais analisados por ecocardiografia, o estresse crônico não produziu qualquer alteração (Tabela 2).

Função do músculo papilar

A Tabela 3 resume as propriedades mecânicas do músculo papilar isolado dos grupos C e St em condição basal. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos.

Depois de manobras inotrópicas e lusitrópicas, a aplicação de estresse induziu várias diferenças. Na CPR, os animais que foram expostos a estresse evidenciaram aumentos de DT, dT/dt e $-dT/dt$ em relação ao grupo controle (Figura 2). À medida que o número de manobras aumentou, a concentração de Ca^{2+} extracelular e os parâmetros DT, $+dT/dt$ e $-dT/dt$ foram significativamente aumentados em ratos estressados (Figura 3).

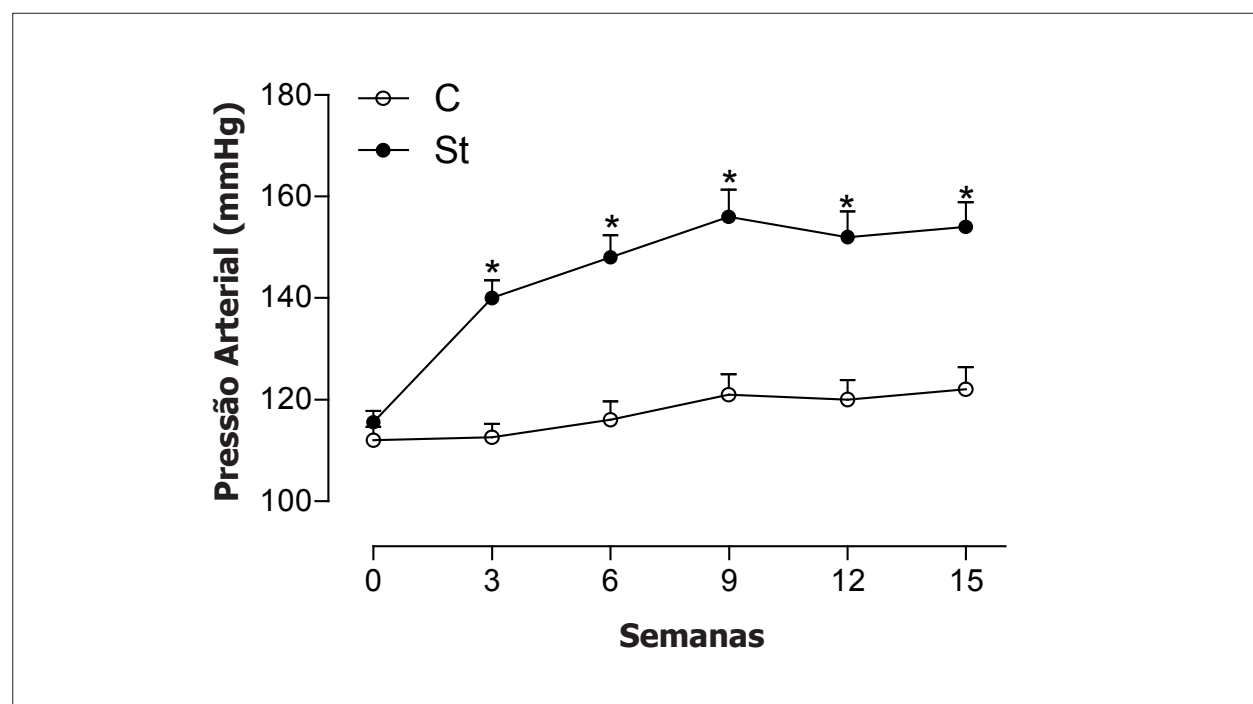


Fig. 1 - Desenvolvimento da pressão arterial de ratos controle (C) ou ratos submetidos a estresse crônico (St). Estresse crônico: estresse de imobilização 1h/dia, 5 vezes por semana, durante 15 semanas. Número de animais: 8; * $p \leq 0,05$; ANOVA e teste de Bonferroni.

Tabela 1 - Avaliação cardíaca estrutural

Variáveis	Grupos	
	C	St
DDVE (mm)	8,33 ± 0,41	8,28 ± 0,42
EDPPVE (mm)	1,38 ± 0,1	1,35 ± 0,1
EDSIV (mm)	1,41 ± 0,1	1,37 ± 0,1
DSVE (mm)	3,79 ± 0,23	3,92 ± 0,11
ESPPVE (mm)	2,98 ± 0,3	2,46 ± 0,1
ESSIV (mm)	2,81 ± 0,2	2,36 ± 0,2
AE (mm)	5,45 ± 0,49	5,92 ± 0,61
AE/PC (mm/Kg)	12,0 ± 2,17	13,0 ± 1,89
MVE (mm)	0,81 ± 0,12	0,79 ± 0,11
IMVE (mm/kg)	1,67 ± 0,11	1,78 ± 0,15*

Valores em média ± desvio padrão; VE: ventrículo esquerdo; AE: átrio esquerdo; PC: peso corporal; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; EDPPVE: espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; ESPPVE: espessura sistólica da parede posterior do ventrículo esquerdo; ESSIV: espessura sistólica do septo interventricular; MVE: massa ventricular esquerda; IMVE: índice de massa ventricular esquerda. Número de animais: 8; *p < 0,05; ANOVA e t de Student.

Tabela 2 - Avaliação funcional cardíaca

Variáveis	Grupos	
	C	St
FC (bpm)	294 ± 55	287 ± 31
% Enc. Meso.	33,49 ± 4,0	32,54 ± 1,8
% Enc. Endo.	54,51 ± 5,8	52,72 ± 1,6
VEPP (mm)	37,23 ± 3,5	37,38 ± 3,3
Mitral E (cm/s)	90,1 ± 11,5	87,3 ± 5,2
Mitral A (cm/s)	59,9 ± 10,9	55,7 ± 6,6
E/A	1,49 ± 0,4	1,58 ± 0,1
TDE (ms)	48,7 ± 6,3	45,2 ± 4,1
TRI (ms)	23,14 ± 4,3	22,90 ± 2,3

Valores em média ± desvio padrão; FC: frequência cardíaca; % Enc. Meso.: fração de encurtamento mesocárdico relativo; % Enc. Endo.: fração de encurtamento endocárdico relativo; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; Mitral E: onda E mitral; Mitral A: onda A mitral; E/A: proporção de ondas E e A; TDE: tempo de desaceleração da onda E; TRI: tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo. Número de animais: 8.

Tabela 3 - Dados basais da função do músculo papilar do VE isolado

Variáveis	Grupos	
	C	St
DT (g/mm ²)	6,64 ± 0,79	6,92 ± 1,31
+dT/dt (g/mm ² /s)	71,6 ± 11,1	75,1 ± 13,9
-dT/dt (g/mm ² /s)	19,9 ± 2,1	21,1 ± 7,4

Valores em média ± desvio padrão; DT: máximo de tensão desenvolvida; +dT/dt: pico das derivadas de tensão positivas; -dT/dt: pico das derivadas de tensão negativas. Número de animais: 8.

O bloqueio do canal de Ca²⁺ tipo L pelo diltiazem, no entanto, não conduziu a quaisquer alterações, como o aumento nas manobras aumentou, conforme previsto, a concentração de Ca²⁺ extracelular em todos os parâmetros analisados (Figura 4).

Discussão

A resposta ao estresse é subordinada à intensidade, duração e tipo de estressor¹⁸. No presente estudo, o modelo de estresse crônico não produz alterações significativas no peso corporal, ingestão calórica e eficiência alimentar. Esses resultados desafiam outras investigações que tentam corroborar a noção de que o estresse induz anorexia e perda de peso corporal por meio de modelos de ratos^{19,20}. A literatura mostra que uma minoria de 30% dos seres humanos perde peso durante ou após o estresse, enquanto a maioria das pessoas ganha peso por causa do aumento na ingestão alimentar^{21,22}.

Neste trabalho, o estresse aumentou os níveis de corticosterona sistêmicos. Os autores ressaltaram que o estresse é capaz de aumentar os níveis desse hormônio, de acordo com a função putativa do hormônio do estresse corticosterona, envolvendo o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e o sistema simpático-adrenomedular. O hormônio liberador de corticotropina (HLC) liberado pelo hipotálamo estimula a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da pituitária anterior. O ACTH circulante atua na zona fasciculada do córtex adrenal onde estimula a liberação de cortisol em seres humanos e corticosterona em ratos^{18,23}.

Esse aumento de corticosterona está associado com a hipertrofia das glândulas adrenais. Vários pesquisadores têm utilizado o peso fresco da glândula adrenal, um órgão que responde ao estresse, como indicativo de condições estressogênicas⁸. O peso da glândula adrenal pode ser reduzido ou pode permanecer inalterado após a exposição ao estresse agudo, mas é frequentemente aumentado pelo estresse crônico^{24,25}.

No presente estudo, os animais submetidos a estresse apresentaram hipertensão arterial. A pressão arterial é controlada por meio de vários sistemas, entre eles o sistema nervoso simpático, sistema renina-angiotensina-aldosterona, e estresse oxidativo, que causa vasoconstrição periférica²⁶⁻²⁸. Essa hipertensão observada em ratos submetidos a estresse provavelmente está relacionada aos sistemas mencionados acima; no entanto, esses mecanismos não foram avaliados

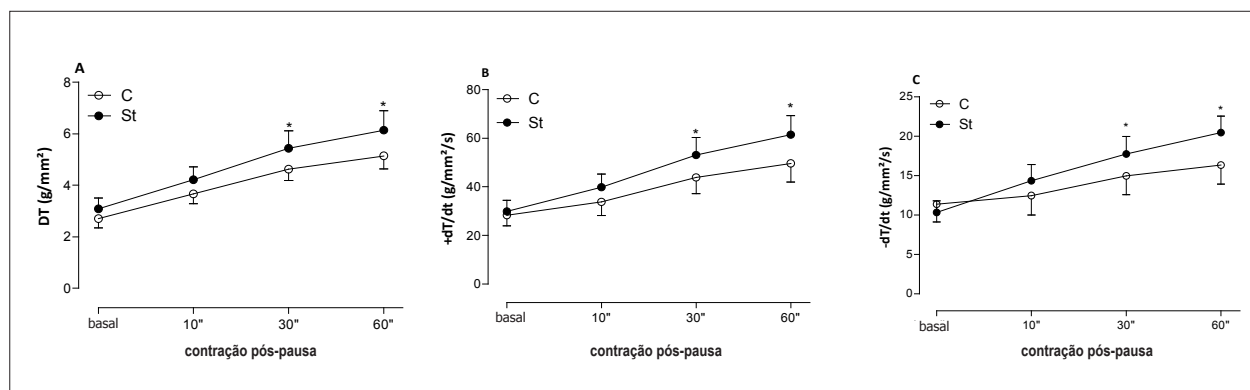


Fig. 2 - Contração pós-reposo de ratos controle (C) ou ratos submetidos a estresse crônico (St). Estresse crônico: estresse de imobilização 1h/dia, cinco vezes por semana, durante 15 semanas. A: máxima tensão desenvolvida normalizada por área de secção transversal (DT); B: pico das derivadas positivas normalizadas por área de secção transversal positiva (+dT/dt); C: pico das derivadas de tensão negativas normalizadas por área de secção transversal positiva (-dT/dt). Número de animais: 8; * $p \leq 0,05$; ANOVA e teste de Tukey.

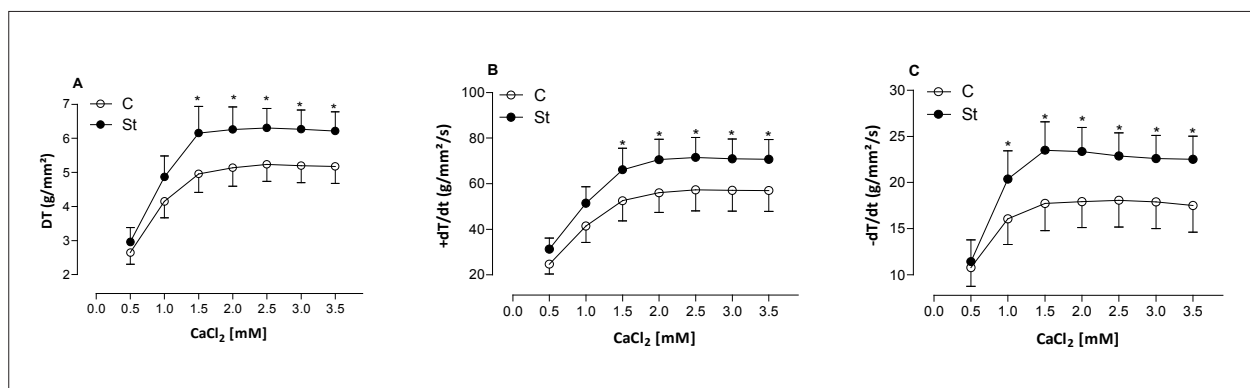


Fig. 3 - Aumento da concentração de Ca²⁺ extracelular de ratos controle (C) ou ratos submetidos a estresse crônico (St). Estresse crônico: estresse de imobilização 1h/dia, cinco vezes por semana, durante 15 semanas. A: máxima tensão desenvolvida normalizada por área de secção transversal (DT); B: pico das derivadas positivas normalizadas por área de secção transversal positiva (+dT/dt); C: pico das derivadas de tensão negativas normalizadas por área de secção transversal positiva (-dT/dt). Número de animais: 8; * $p \leq 0,05$; ANOVA e teste de Tukey.

neste estudo em particular. Esse resultado corrobora os achados caracterizados na literatura, que observou esse tipo de alterações em humanos estressados⁵. Esses resultados apoiam fortemente modelo de estresse utilizado na presente pesquisa é um bom modelo para estudar o estresse crônico, uma vez que vários distúrbios vinculados ao estresse, incluindo hipercorticonemia, hipertrofia das glândulas adrenais e hipertensão arterial, podem ser investigadas com esse modelo. Esse estresse também gerou hipertrofia do ventrículo esquerdo cardíaco, avaliado pela ecocardiografia e estudos *post-mortem*; esses achados corroboram a literatura⁹. A proliferação da massa cardíaca está relacionada com cativações neuro-humorais, envolvendo o sistema nervoso simpático, sistema renina-angiotensina-aldosterona, estresse oxidativo e fatores mecânicos, bem como hipertensão arterial²⁹.

O estudo ecocardiográfico não revelou alterações significativas na função ventricular sistólica e diastólica esquerda. No entanto, o papel do miocárdio avaliado em condições basais também não apresentou nenhuma alteração;

o músculo papilar estressado apresentou melhora da resposta inotrópica para a contração pós-reposo, e um aumento da concentração de cálcio extracelular. Atualmente, várias investigações têm utilizado essas manobras para identificar alterações nas fases de contração e relaxamento, que podem eventualmente não ser observadas em condições basais; além disso, elas ajudam na compreensão dos possíveis mecanismos responsáveis por alterações na atividade cardíaca³⁰.

O mecanismo responsável por essa melhora da função miocárdica ainda não está claro; portanto, só podemos especular sobre o mecanismo intrínseco responsável por esses resultados. A melhor resposta dos ratos estressados pode ser devida ao aumento na sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio^{31,32} e ao aumento na absorção^{33,34} do cálcio no retículo sarcoplasmático induzido pelo estresse crônico. Esses postulados são extrapolados de um estudo³⁵ anterior que observou melhor resposta inotrópica ao cálcio em ratos submetidos a exercício físico. Exercício e estresse são semelhantes em relação a várias características

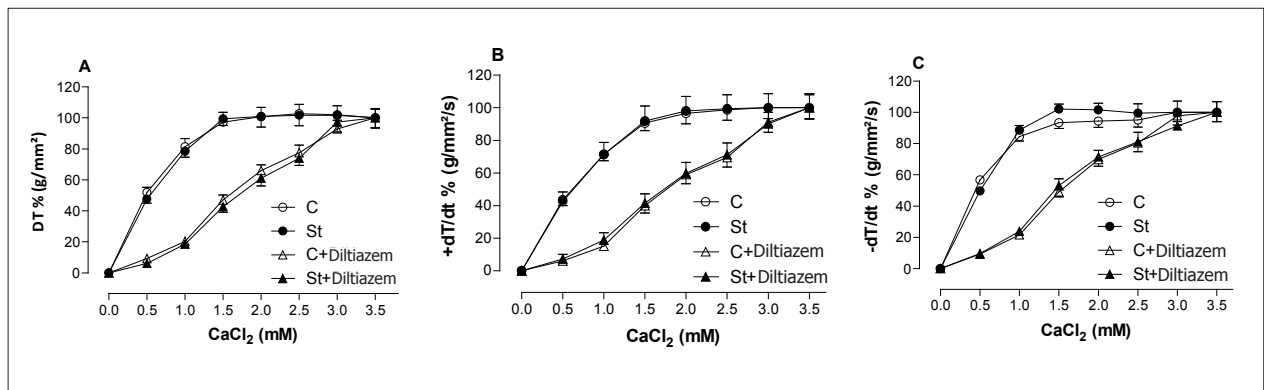


Fig. 4 - Aumento da concentração de Ca²⁺ extracelular, em presença ou ausência de diltiazem (10⁻⁴ M) para ratos controle (C) ou ratos submetidos a estresse crônico (St). Estresse crônico: estresse de imobilização 1h/dia, cinco vezes por semana, durante 15 semanas. A: máxima tensão desenvolvida normalizada por área de secção transversal (DT); B: pico das derivadas positivas normalizadas por área de secção transversal positiva (+dT/dt); C: pico das derivadas de tensão negativas normalizadas por área de secção transversal positiva (-dT/dt). Número de animais: 8; *p ≤ 0,05; ANOVA e teste de Tukey.

neuroendócrinas, tais como aumento do nível de vasopressina, ACTH, aldosterona, corticosterona e catecolaminas³⁶. A hipertrofia da glândula adrenal observada neste estudo está em concordância com o pressuposto de que o sistema simpático-adrenomedular poderia participar na melhor resposta do coração ao cálcio.

Os estudos dos nossos grupos também avaliaram a participação do canal de Ca²⁺ tipo L usando o bloqueador de cálcio, diltiazem; a inclusão desse agente diminuiu o fornecimento de Ca²⁺ ao tecido¹⁷. O resultado com o diltiazem não alterou a função do músculo papilar entre os grupos, sugerindo que a atividade do canal de Ca²⁺ tipo L foi semelhante em ambos os grupos. A literatura tem ainda para mostrar a utilização de uma metodologia semelhante. Zhao e cols.¹⁴ observaram um aumento na densidade do canal de Ca²⁺ tipo L e na corrente de cálcio, em ratos submetidos a estresse de imobilização durante 21 dias consecutivos, em miócitos ventriculares. Contrastando esse resultado, nossas investigações resultaram em densidade de canal Ca²⁺ tipo L e corrente de cálcio, proporcionais entre os grupos. Essa diferença pode ser devida ao período extenso de exposição ao estresse, indicando uma resposta adaptativa das células cardíacas.

Em conclusão, os dados produzidos neste estudo estão em conflito com nossas hipóteses iniciais. O estresse crônico não deprime a função cardíaca em condições basais e melhora a resposta do miocárdio à estimulação inotrópica. Os resultados demonstram que o canal de Ca²⁺ tipo L não está envolvido na melhora da função do miocárdio ao estímulo do estresse.

Mais estudos são necessários para entender melhor o efeito do estresse sobre o desempenho cardíaco. Esses resultados sugerem que alterações cardíacas de indivíduos estressados são observadas apenas após exposição a estímulos extrínsecos, e essa resposta pode ser uma resposta adaptativa a condições de estresse, com o objetivo de proteger o indivíduo de doença cardiovascular. O presente trabalho contribui para o conjunto de conhecimentos sobre as alterações cardíacas associadas ao estresse e, conseqüentemente, poderia ajudar os médicos a oferecerem conselhos úteis para os pacientes, pois o estresse é uma das principais causas de doenças cardiovasculares.

Agradecimentos

Pesquisa financiada pela Fapesp (2009/03771-2).

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado por FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte da tese de mestrado de Thiago Bruder Nascimento pela Universidade de São Paulo.

Referências

1. Bidzinska EJ. Stress factors in affective diseases. *Brit J Psychiat*. 1984;144:161-6.
2. Selye HA. Syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*. 1936 July 4;138:32.
3. VanTallie TB. Stress: a risk factor for serious illness. *Metabolism*. 2002;51(Suppl. 1):40-5.
4. Levine TB, Levine AB. *Metabolic syndrome and cardiovascular disease*. Philadelphia: Elsevier; 2006.
5. Schwartz AR, Gerin W, Davidson KW, Pickering TG, Brosschot JF, Thayer JF, et al. Toward a causal model of cardiovascular responses to stress and the development of cardiovascular disease. *Psychosom Med*. 2003;65(1):22-35.
6. Chida Y, Steptoe A. Greater cardiovascular responses to laboratory mental stress are associated with poor subsequent cardiovascular risk status: a meta-analysis of prospective evidence. *Hypertension*. 2010;55(4):1026-32.
7. Yalçın F, Yalçın H, Abraham T. Stress-induced regional features of left ventricle is related to pathogenesis of clinical conditions with both acute and chronic stress. *Int J Cardiol*. 2010;145(2):367-8.
8. Bruder-Nascimento T, Cordellini S. Vascular adaptive responses to physical exercise and to stress are affected differently by nandrolone administration. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44(4):337-44.
9. Costoli T, Bartolomucci A, Graiani G, Stilli D, Laviola G, Sgoifo A. Effects of chronic psychosocial stress on cardiac autonomic responsiveness and myocardial structure in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(6):H2133-40.
10. Zhao Y, Wang WY, Qian LJ. Hsp70 may protect cardiomyocytes from stress-induced injury by inhibiting Fas-mediated apoptosis. *Cell Stress Chaperones*. 2007;12(1):83-95.
11. Saulia AI, Golubeva Llu, Meerson FZ. [Effect of emotional and pain stress on the contractile function of the hypertrophied heart muscle]. *Biull Eksp Biol Med*. 1985;99(2):145-7.
12. Meerson FZ, Malyshev Ilu, Sazonova TE. [Prevention of arrhythmogenic and contractile effects of excessive Ca²⁺ on the heart through adaptation to stress by increasing the activity of sarcoplasmic reticulum]. *Kardiologia*. 1989;29(8):69-75.
13. Krepsova K, Micutkova L, Novotova M, Kubovcakova L, Kvetnansky R, Krizanova O. Repeated immobilization stress decreases mRNA and protein levels of the type 1 IP3 receptor in rat heart. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1018:339-44.
14. Zhao Y, Xu J, Gong J, Qian L. L-type calcium channel current up-regulation by chronic stress is associated with increased alpha(1c) subunit expression in rat ventricular myocytes. *Cell Stress Chaperones*. 2009;14(1):33-41.
15. Bers DM. Sarcoplasmic reticulum Ca release in intact ventricular myocytes. *Front Biosci*. 2002;7:d1697-711.
16. Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type Ca²⁺ currents and human atrial fibrillation. *Circ Res*. 1999;85(5):428-36.
17. Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, do Nascimento AF, de Campos DH, Luvizotto Rde A, et al. Involvement of L-type calcium channel and SERCA2A in myocardial dysfunction induced by obesity. *J Cell Physiol*. 2011;226(11):2934-42.
18. Adam TC, Epel ES. Stress eating and reward system. *Physiol Behav*. 2007;91(4):449-58.
19. Marti O, Gavalda A, Gomez F, Armario A. Direct evidence for chronic stress-induced facilitation of the adrenocorticotropin response to a novel acute stressor. *Neuroendocrinology*. 1994;60(1):1-7.
20. Michajlovskij N, Lichardus B, Kvetnansky R, Ponc J. Effect of acute and repeated immobilization stress on food and water intake, urine output and vasopressin changes in rats. *Endocrinol Exp*. 1988;22(3):143-57.
21. Stone AA, Brownell KD. The stress-eating paradox: multiple daily measurements in adult males and females. *Psychol Health*. 1994;9(6):425-36.
22. Epel E, Jimenez S, Brownell K, Stroud L, Stoney C, Niaura R. Are stress eaters at risk for the metabolic syndrome? *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1032:208-10.
23. Huizenga NA, Koper JW, de Lange P, Pols HA, Stolk RP, Grobbee DE, et al. Interperson variability but intraperson stability of baseline plasma cortisol concentrations, and its relation to feedback sensitivity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to a low dose of dexamethasone in elderly individuals. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(1):47-54.
24. Van Dijken HH, de Goeij DC, Sutanto W, Mos J, de Kloet ER, Tilders FJ. Short inescapable stress produces long-lasting changes in the brain-pituitary-adrenal axis of adult male rats. *Neuroendocrinology*. 1993; 58(1):57-64.
25. Pertsov SS, Koplik EV, Krauser V, Mikhael' N, Eme P, Sudakov KV. [Adrenal glands catecholamines of August and Wistar rats in acute emotional stress]. *Biull Eksp Biol Med*. 1997;123(6):645-8.
26. Pausova Z. From big fat cells to high blood pressure: a pathway to obesity-associated hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006;15(2):173-8.
27. Relling DP, Esberg LB, Fang CX, Johnson WT, Murphy EJ, Carlson EC, et al. High fat diet induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxic and apoptosis. *J Hypertens*. 2006;24(3):549-61.
28. Boustany-Kari CM, Gong M, Akers WS, Guo Z, Cassis LA. Enhanced vascular contractility and diminished coronary artery flow in rats made hypertensive from diet-induced obesity. *Int J Obes*. 2007;31(11):1652-9.
29. Katz AM. *Physiology of the heart*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
30. du Toit EF, Nabben M, Lochner A. A potential role for angiotensin II in obesity induced cardiac hypertrophy and ischaemic/reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*. 2005;100(4):346-54.
31. Wisløff U, Loennechen JP, Falck G, Beisvag V, Currie S, Smith G, et al. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovasc Res*. 2001;50(3):495-508.
32. Moore RL, Musch TI, Yelamarty RV, Scaduto RC Jr, Semanchick AM, Elensky M, et al. Chronic exercise alters contractility and morphology of isolated rat cardiac myocytes. *Am J Physiol*. 1993;264(5 Pt 1):C1180-9.
33. Buttrick PM, Kaplan M, Leinwand LA, Scheuer J. Alterations in gene expression in the rat heart after chronic pathological and physiological loads. *J Mol Cell Cardiol*. 1994;26(1):61-7.
34. Taffet GE, Michael LA, Tate CA. Exercise training improves lusitropy by isoproterenol in papillary muscles from aged rats. *J Appl Physiol*. 1996;81(4):1488-94.
35. Sugizaki MM, Dal Pai-Silva M, Carvalho RF, Padovani CR, Bruno A, Nascimento AF, et al. Exercise training increases myocardial inotropic response in food restricted rats. *Int J Cardiol*. 2006;112(2):191-201.
36. Wilmore JH, Costill DL, Kenney WL. *Physiology of sport and exercise*. 3rd ed. Champaign: Human Kinetics Publishers; 2008.