

Miocardio Remodelado después de Grandes Infartos en Ratas Convierte Potenciación Post-pausa en Disminución de la Fuerza

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

Resumen

Fundamento: La Contracción pos pausa (CPP) del músculo cardíaco provee informaciones indirectas sobre la manejo del calcio intracelular.

Objetivo: Nuestro objetivo fue estudiar el comportamiento de la CPP y sus mecanismos subyacentes en Ratas con infarto de miocardio.

Métodos: Seis semanas después de la oclusión coronaria, la contractilidad de los Músculos Papilares (MP) obtenidos a partir de Ratas sometidos a falsa cirugía (C, n = 17), con infarto moderado (MMI, n = 10) y gran infarto (LMI, n = 14), fue evaluada después de pausas de estímulos de 10 a 60 segundos antes y después de la incubación con cloruro de litio (Li⁺) en substitución del cloruro de sodio o rianodina (Ry). La expresión proteica de SR Ca(2+)-ATPasa (SERCA2), intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (NCX), fosfolamban (PLB) y fosfo-Ser (16)-PLB fue analizada por Western blotting.

Resultados: Los Ratas MMI presentaron potenciación de CPP reducida en comparación a los Ratas C. En oposición a la potenciación normal para Ratas C, fueron observadas decaimientos de fuerza post-reposo en los músculos de Ratas LMI. Además de eso, la Ry bloqueó la decaimiento o potenciación de PRC observada en Ratas LMI y C; el Li⁺ inhibió el NCX y convirtió la decaimiento en potenciación de CPP en Ratas LMI. Aunque los Ratas MMI y LMI hayan presentado disminución en el SERCA2 (72 ± 7% y 47 ± 9% de Ratas control, respectivamente) y expresión proteica de fosfo-Ser¹⁶-PLB (75 ± 5% y 46 ± 11%, respectivamente), la superexpresión del NCX (175 ± 20%) sólo fue observada en los músculos de Ratas LMI.

Conclusión: Nuestros resultados mostraron, por primera vez, que el remodelado miocárdico post-IAM en Ratas puede cambiar la potenciación regular para decaimiento post-reposo, afectando las proteínas de manejo del Ca(2+) en miocitos. (Arq Bras Cardiol 2012;98(3):243-251)

Palabras clave: Remodelado cardíaco ventricular, infarto de miocardio, relajación muscular, fuerza muscular, Ratas.

Introducción

En el músculo cardíaco, tanto el influjo de calcio (Ca²⁺) por el sarcolema como la liberación de Ca²⁺ en el Retículo Sarcoplasmático (RS) contribuyen para la activación de miofilamentos durante la contracción, y en la mayoría de los mamíferos, la liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ a partir del SR es cuantitativamente dominante¹⁻³. Los mecanismos básicos celulares de la contracción muscular cardíaca son significativamente modulados por el ritmo de estimulación. Así, cambios en la frecuencia y en el ritmo cardíaco son normalmente usados como maniobras experimentales para evaluar el comportamiento o revelar anomalías en la cinética de Ca²⁺ en el acoplamiento excitación-contracción³. Así, la Contracción pos pausa (CPP) permite una evaluación indirecta de la función del RS^{2,4,5}. En el miocardio de Ratas normales, la CPP es potenciada por el Ca²⁺ adicional acumulado en el RS

durante la pausa en razón de actividad de Ca²⁺-ATPasa (SERCA2) en el RS y de la liberación fraccionaria de Ca²⁺ 2,5 mediante la activación. Por otro lado, la CPP es negativamente modulada por el eflujo de Ca²⁺ a lo largo del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ 1,2,6,7.

El remodelado ventricular que sucede después del Infarto de Miocardio (IM) muchas veces lleva al compromiso de la función contráctil del miocardio no infartado⁸⁻¹¹, estando asociado al compromiso de la manipulación intracelular Ca²⁺ 12,13. Como resultado, fue propuesto que la potenciación post-reposo pudiese ser alterada patológicamente por una alteración en la cinética del calcio^{14,15}. Informes anteriores describieron reducción de la potenciación post-reposo en los músculos papilares del ventrículo izquierdo de Ratas con IM curado de diferentes tamaños de infarto^{9,10}. Recientemente, fue identificada, por primera vez, la decaimiento de las contracciones post-reposo en Ratas con insuficiencia cardíaca crónica¹⁶. Considerando que los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a la génesis de la Contracción pos pausa en el miocardio de Ratas después del remodelado no están completamente definidos, en el presente informe fue investigada la CPP del músculo papilar ventricular izquierdo remanente del MI, y su relación con el remodelado molecular de las principales proteínas de manipulación de Ca²⁺.

Correspondencia: Danilo Sales Bocalini •

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

Artículo recibido el 31/05/11, revisado recibido el 13/09/11; aceptado el 20/09/11.

Métodos

Animales

Ratas Wistar pesando 180-220 g fueron tratados y utilizados de acuerdo con los *Principles of Laboratory Animal Care* (Publicación del NIH No. 86-23, revisados en 1985) y el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad Federal de São Paulo (CEP# 0340/08).

Infarto de miocardio experimental

El IM fue producido por la ligadura permanente de la arteria coronaria, como fue descrito por nuestro laboratorio en publicaciones anteriores^{11,17}. Brevemente, bajo anestesia (ketamina 50 mg/kg y xilazina 10 mg/kg, via intraperitoneal) y ventilación artificial (Harvard Rodent Ventilator, modelo 863, Harvard Apparatus, Holliston, MA), fue hecha una toracotomía izquierda. El corazón fue exteriorizado y la arteria coronaria descendente anterior fue ligada con sutura de polipropileno 6-0. El corazón fue rápidamente reposicionado y el tórax fue cerrado. Ratas sometidos a la falsa cirugía fueron considerados el grupo control (C). Todos los resultados morfológicos y funcionales fueron evaluados seis semanas después de la producción del IM.

Función cardíaca global y morfología

A fin de caracterizar el IM, así como las dimensiones y la función del corazón, fue realizado un ecocardiograma con Doppler en animales anestesiados (misma mezcla de ketamina con xilazina) seis semanas después de la cirugía. Esos procedimientos fueron realizados por un observador ciego a la condición animal, usando un instrumento HP SONOS 5500 (Philips Medical System, Andover, MA, EUA) con un transductor de 12 MHz a una profundidad de 2 cm, de acuerdo con metodología previamente descrita^{11,17,18}. Imágenes transversales fueron obtenidas en los niveles basal (en la extremidad de las valvas de la válvula mitral), medio (al nivel de los músculos papilares) y apical (distal al músculo papilar, pero además del tapón de la cavidad). El tamaño del infarto fue estimado como la identificación subjetiva de acinesia o discinesia de la pared ventricular izquierda (VI) en cada plano transversal y presentado como el largo del arco correspondiente al segmento de la cicatriz del IM en relación al perímetro total del borde endocárdico del VI. Recientemente, demostramos que esa medida ecocardiográfica está satisfactoriamente de acuerdo con la coloración histoquímica¹⁸. Los animales infartados fueron divididos en dos grupos, de acuerdo con el tamaño del IM: un grupo compuesto de Ratas con IM moderado, entre 20% y 39% del VI (MMI), y otro grupo de Ratas con IM mayor que 39% del VI (LMI).

Los diámetros diastólico y sistólico final del VI fueron medidos a partir del corte transversal paraesternal usando imágenes en modo M. La función sistólica fue definida por la fracción de acortamiento y calculada como la media porcentual de variación entre los diámetros diastólico y sistólico. La función diastólica fue analizada por la curva de velocidad de flujo diastólico mitral por el Doppler pulsado. A partir de una vista de 4 cámaras, fueron adquiridos el pico de la onda E y velocidades de la onda A y calculada la razón E/A.

Mecánica muscular cardíaca aislada

Inmediatamente después del examen ecocardiográfico, fueron hechas preparaciones *in vitro* del músculo papilar aislado del VI¹⁹. El corazón fue rápidamente removido y colocado en solución Krebs-Henseleit oxigenada tamponada a 29 °C. El músculo papilar posterior del VI fue cuidadosamente disecado y verticalmente inserido en un baño de órganos calentado a 29 °C y 100% oxigenado. El músculo fue acoplado a un transductor de fuerza isométrica (GRASS FT-03, Astro-Med, Inc. RI, EUA) conectado a un micrómetro para ajustes de largo muscular. La composición de la solución de Krebs-Henseleit fue la siguiente (en mM): 135 NaCl; 4,69 KCl, 1,5 CaCl₂; MgSO₄ 1,16; KH₂PO₄ 1,18; 5,50 glucosa, 10 U de insulina y 20 HEPES, tamponado a pH 7,4. Las preparaciones fueron estimuladas a 0,2 Hz, con 5 ms de pulsos de onda cuadrada a través de electrodos de platino paralelos con tensiones ajustadas para aproximadamente 10% más del mínimo necesario para producir respuesta mecánica máxima. Después de 60 min. de estabilización en la condición de baja carga, el músculo fue cargado para contraer isométricamente y estirado hasta el largo máximo de su curva de largo-tensión ($L_{m\acute{a}x}$). Los tests fueron realizados en $L_{m\acute{a}x}$ (largo ideal para contracción), y la tensión isométrica fue evaluada por la fuerza normalizada para el área de la sección transversal del músculo (g mm⁻²). Los siguientes parámetros fueron obtenidos: Tensión de Reposo (TR), pico de la Tensión Desarrollada (TD) y su primera derivada (dT/dt), tiempo para alcanzar el pico de la tensión desarrollada (TPT) y tiempo para 50% de relajación (TR50). CPPs relativas fueron medidas en tres grupos experimentales utilizando duraciones de pausa de 10, 15, 30, 45 y 60 segundos. La CPP relativa fue expresada como la amplitud de la TD post-reposo dividida por la TD en estado estacionario. Para investigar el papel del RS y NCX en la CPP, ese protocolo fue repetido en la presencia de rianodina 1 μ M para inhibir la función del RS²⁰, usando una versión modificada de solución KH con cero [Na⁺] y 135 mM de cloruro de litio (Li⁺) para inhibir la función del NCX²¹. El Li⁺ fue substituido por Na⁺, porque pasa por el canal de Na⁺, manteniendo la excitabilidad del miocito mientras los intercambiadores de membrana no son capaces de usar Li⁺ para el intercambio²¹.

Parámetros biométricos

Después de la remoción del músculo papilar, los ventrículos derecho e izquierdo fueron separados y pesados. El pulmón derecho también fue excisado y pesado. Después de secado a 70 °C durante 12h, el Tenor de Agua Pulmonar (TAP), considerado un índice de congestión, fue determinado utilizando la siguiente ecuación: TAP (%) = (pérdida de peso después del secado / peso húmedo) \times 100.

Expresión proteica de SERCA2, fosfolamban y NCX

El tenor de proteína fue analizado en muestras de VI remanente de los grupos LMI, MMI y C después de la escisión de los músculos papilares y cicatrización del infarto. Homogeneizados de tejido fueron analizados por Western blotting de acuerdo con protocolos previamente descritos⁵ para comparar la expresión proteica de SERCA2, fosfolamban (PLB), fosfo-Ser¹⁶-PLB y NCX en todos los grupos experimentales. Muestras de miocardios no infartados fueron rápidamente congeladas a -70 °C. Los tejidos fueron homogeneizados en tapón de extracción helado (Tris 50 mM, EDTA 1 mM y sacarosa mM

Artículo Original

250, pH 7,4) usando Polytron (Polytron® PT2100, Kinematica AG, Littau, LU, SWI). Para preparar las fracciones microsomas de proteínas, fue hecha una centrifugación inicial a $10.000 \times g$ por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue centrifugado a $100.000 \times g$ por 60 min. El pellet, el que representa la fracción microsomal, fue resuspendido en tapón Tris-EDTA (Tris 50 mM, EDTA 1,0 mM, pH 7,4). Veinticinco microgramos de proteína del VI y estándares moleculares SDS-PAGE precoloreados (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, EUA) fueron separados por electroforesis en SDS-PAGE 7,5% o 12% (para NCX o SERCA2 y PLB, respectivamente) y, enseguida, transferidos para membranas de polivinil difluoruro durante la noche a 4 °C, usando un sistema celular de transferencia Mini Trans-Blot (Bio-Rad) conteniendo Tris 25 mM, glicina 190mM, metanol 20% y SDS 0,05%. La eficiencia de transferencia y la igualdad de carga de proteína fueron verificadas a través de la coloración de Ponceau S 1% (Caledon Laboratories, Georgetown, ON, CAN), previamente validado como una alternativa eficiente para el control de calidad y carga de las muestras²². Enseguida, la membrana fue bloqueada por 60 minutos a temperatura ambiente en solución tamponada Tris (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,4) con 5% de leche descremada en polvo. Enseguida, la membrana fue incubada durante la noche a 4 °C con anticuerpos monoclonales de Rata anti-NCX1 (dilución 1:1500, anticuerpos suizos Swant®, Bellinzona, CH, SWI), anticuerpos monoclonales de Rata anti-SERCA2 (dilución 1:2.500, Abcam Inc., MA, EUA), anticuerpos monoclonales de Rata anti-PLB (0,25 mg/mL, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, EUA) o anticuerpos monoclonales anti-fosfo-Ser¹⁶-PLB de Rata (1:1000, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, EUA). Después del lavado, la membrana fue incubada por 90 min con un anticuerpo IgG antiRata conjugado con peroxidasa de rábano silvestre (dilución 1:3000; Bio-Rad, CA, EUA). La membrana fue cuidadosamente lavada y los inmunocomplejos fueron detectados a través de sistema de peroxidasa de rábano silvestre/quimioluminiscencia con luminol (ECL Plus, Amersham International plc, Little Chalfont, UK) y, enseguida, sometida a autorradiografía. Partes de proteínas fueron cuantificadas por el software Scion Image (Scion basado en imagen NIH) en unidades arbitrarias de densidad óptica normalizadas por valores medios obtenidos para las muestras C en cada membrana.

Análisis estadístico

Los resultados son expresados como media \pm DEM y analizados por el test *t* de Student o por análisis de varianza (ANOVA mono o bifactorial), seguidos por el test *post hoc* de Bonferroni, según el caso. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Softwares Inc., San Diego, CA, EUA) y las diferencias de $p < 0,05$ fueron consideradas significativas.

Resultados

Biometría y ecocardiograma con Doppler

La tabla 1 muestra que los pesos de los ventrículos derecho e izquierdo aumentaron en el grupo LMI comparados a los controles (grupo C). El grupo MMI se mostró apenas parcialmente alterado en comparación con el grupo C, solamente con índices de peso corazón/cuerpo y VI/cuerpo aumentados. Esos

parámetros estuvieron acompañados por mayor TAP en el grupo LMI en comparación con los grupos MMI y C (tab. 1). Datos ecocardiográficos morfológicos y funcionales (tab. 1) sugieren dilatación de las cavidades cardíacas asociada a disfunción sistólica y diastólica en Rata de ambos grupos infartados, siendo que la mayoría de los parámetros evaluados se mostró más extensamente alterada en el grupo LMI que en el grupo MMI.

Contractilidad miocárdica in vitro

El área transversal fue mayor en el grupo LMI ($1,16 \pm 0,05$ mm², $n = 14$) en comparación con el grupo MMI ($1,01 \pm 0,05$ mm², $n = 10$) y el grupo C ($0,96 \pm 0,04$ mm², $n = 17$). Como podemos ver en la tabla 2, después de seis semanas de oclusión coronaria, los parámetros contráctiles fueron perjudicados en los

Tabla 1 – Parámetros cardíacos

	Control (n = 17)	IM moderado (n = 10)	Gran IM (n = 14)
Biometría			
C/PC (mg g ⁻¹)	2,72 \pm 0,06	3,17 \pm 0,08 *	3,43 \pm 0,11 *
VD/PC (mg g ⁻¹)	0,68 \pm 0,02	0,74 \pm 0,02	0,94 \pm 0,07 *
VI/PC (mg g ⁻¹)	2,20 \pm 0,05	2,52 \pm 0,08 *	2,61 \pm 0,07 *
TAP (%)	79 \pm 0,21	80 \pm 0,31	82 \pm 0,48 *
Ecocardiograma			
DDVI (cm)	0,72 \pm 0,01	0,81 \pm 0,02	0,98 \pm 0,02 *
FA (%)	54,8 \pm 2,04	37,4 \pm 1,44 *	26,3 \pm 1,94 * #
Razón E/A	2,15 \pm 0,1	2,4 \pm 0,2 *	4,86 \pm 0,5 * #
Tamaño del infarto (%)	–	32,8 \pm 1,6	44,8 \pm 1,2 #

Los resultados son expresados como media \pm DEM. IM - Infarto de miocardio; C/PC - Corazón indexado por el peso corporal; VD/PC - Razones del peso del ventrículo derecho y del ventrículo izquierdo (VI/PC) para el peso corporal; TAP - Tenor de agua pulmonar; DDVI - Diámetro diastólico del ventrículo izquierdo; FA - Fracción de acortamiento; E-A - Razón de las velocidades de la onda E/A. * $p < 0,05$ vs. Control y # $p < 0,05$ vs. IM moderado. ANOVA monofactorial y test *post hoc* de Bonferroni.

Tabla 2 – Mecánica del músculo papilar en L_{máx}

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

Los resultados son expresados como media \pm DEM de la tensión desarrollada (TD); IM - Infarto de miocardio; TR - Tensión de reposo; +dT/dt_{máx} - Tasa máxima de desarrollo de tensión y declinación (-dT/dt_{máx}); TPT - Tiempo para el pico de tensión; TR50 - Tiempo para 50% de relajación. * $p < 0,05$ vs. Control y # $p < 0,05$ vs. IM moderado. ANOVA monofactorial y test *post hoc* de Bonferroni.

grupos MMI y LMI en comparación con el grupo C, presentando una depresión de la TD y de la dT/dt positiva. Mientras tanto, solamente el grupo LMI mostró depresión significativa de la dT/dt negativa, así como mayor tiempo de duración de las fases de contracción y relajación.

En la figura 1A, trazados originales ilustran el comportamiento de la CPP de los músculos papilares de Ratas infartados y controles durante las pausas de la estimulación. En el grupo C, la potenciación de la CPP ocurrió, lo que aumentó con la duración de la pausa. Mientras tanto, en los músculos de los grupos

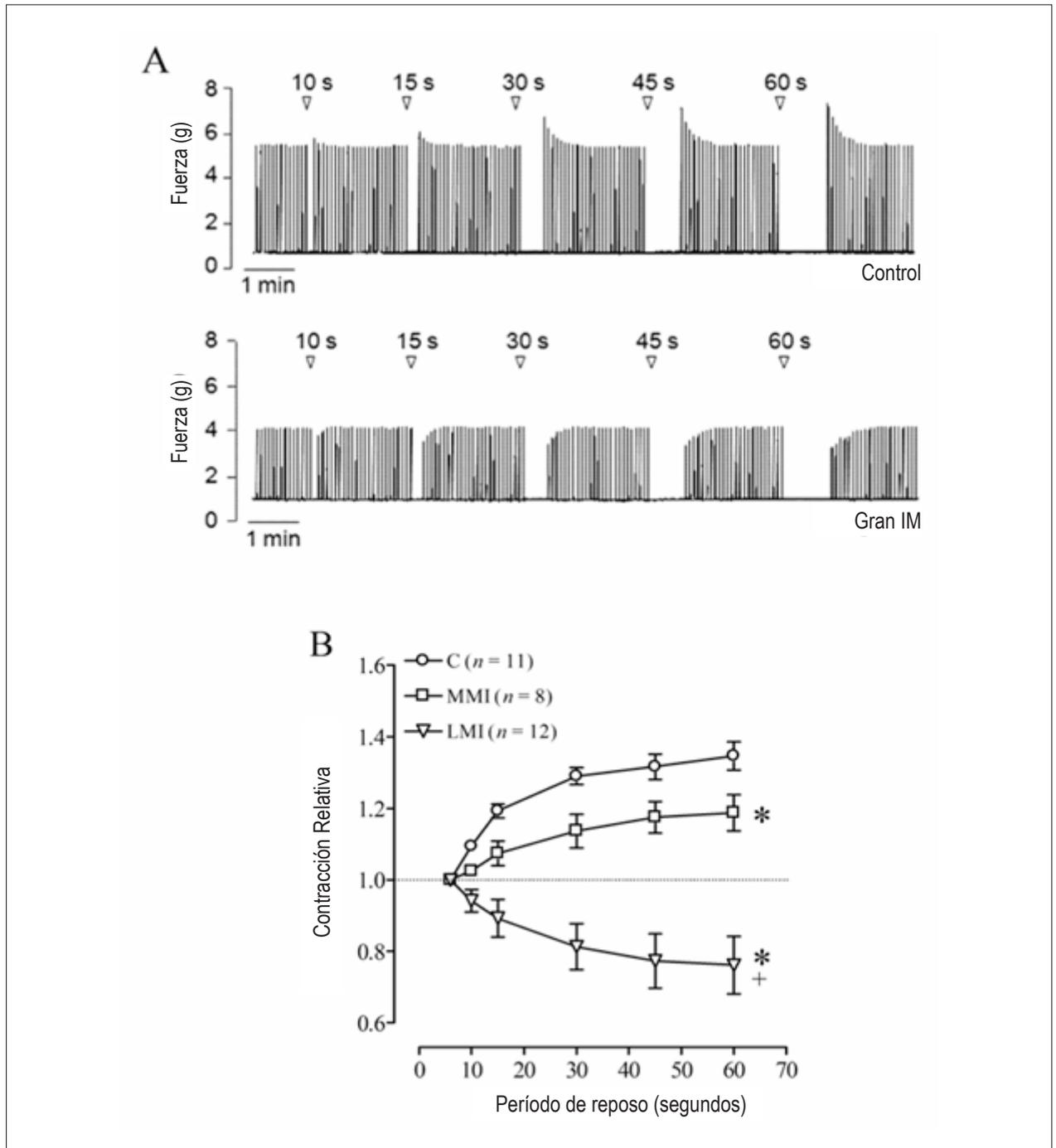


Figura 1 – Contracción pos pausa de las preparaciones del músculo papilar aislado. Paine A, trazados típicos representando la fuerza desarrollada del músculo papilar de Ratas control (superior) y de gran IM (inferior) antes y después de la pausa de estímulo (10 a 60 seg.). La potenciación de contracciones post-reposo es evidenciada en el grupo control, al tiempo que decaimientos de fuerza post-reposo ocurrieron en el músculo de Ratas con gran IM. Paine B, Efecto de la prolongación de las pausas (media \pm DEM) sobre la contracción relativa (CPP dividida por la contracción en estado estacionario) del grupo control (C), grupo de infarto moderado (MMI) y gran infarto (LMI). ANOVA bifactorial y tests post hoc de Bonferroni para datos * $p < 0,05$ vs C. + $p < 0,05$ vs. MMI.

Artículo Original

infartados, el comportamiento de la CPP fue sustancialmente alterado. Mientras el grupo MMI presentó una reducción en esa potenciación de CPP, los músculos en el grupo LMI desarrollaron decaimiento de la fuerza después del reposo en comparación con contracciones en estado estacionario. La decaimiento se acentuó con el aumento de la duración de la pausa (Fig. 1B).

A fin de investigar los mecanismos de la CPP en músculos

papilares de Ratas infartados, fueron utilizadas herramientas farmacológicas (Fig. 2) y moleculares (Fig. 3). Teniendo en vista que apenas el grupo LMI exhibió el comportamiento poco común de la CPP, los siguientes protocolos farmacológicos fueron realizados apenas en el grupo C; en el grupo LMI fueron hechas preparaciones papilares. La administración de Ry ($1 \mu\text{M}$, durante 30 min.) en la solución de Krebs-

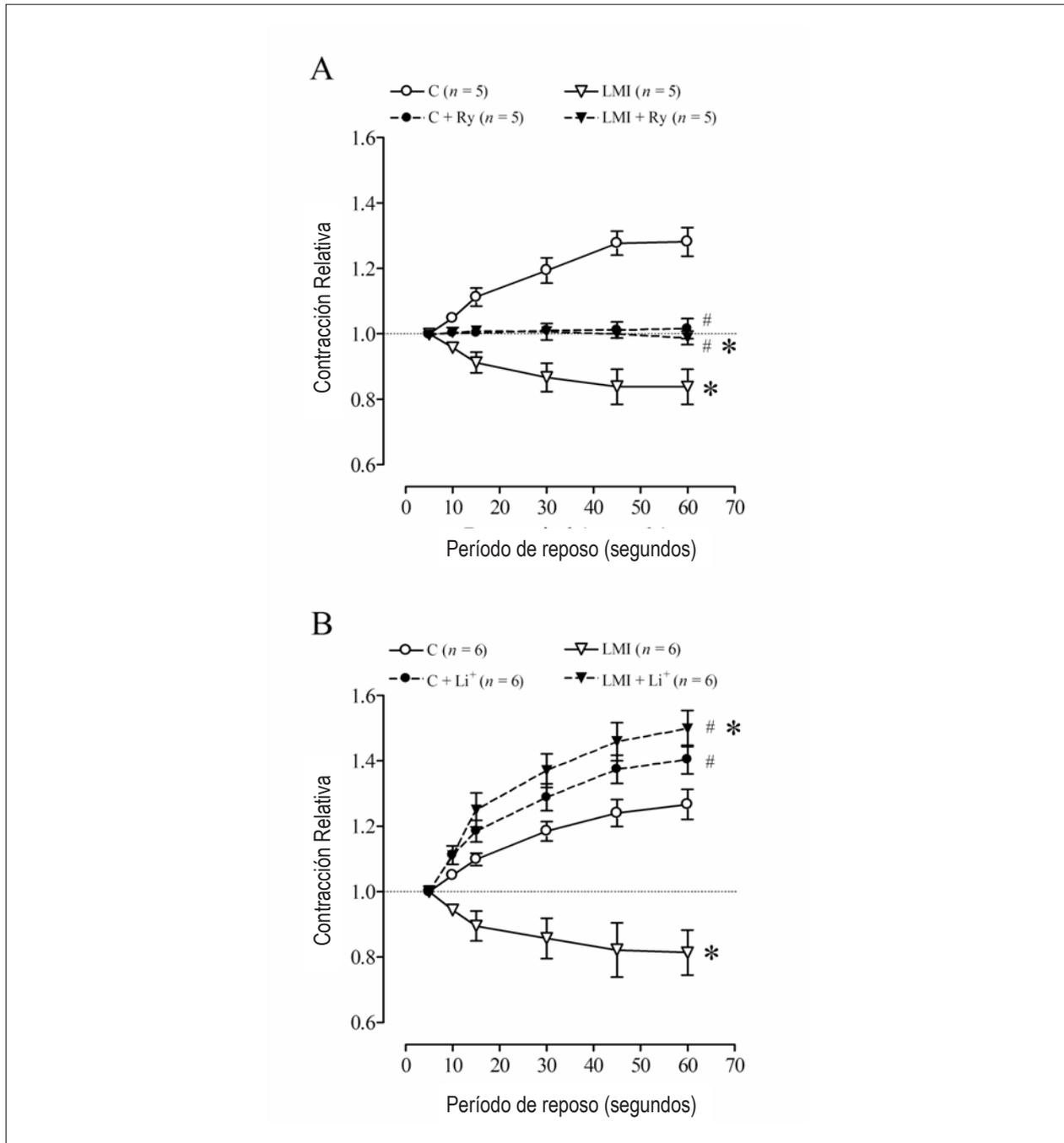


Figura 2 – Efectos de la rianodina (Ry) y cloruro de litio (Li^+) en las contracciones post-reposo. Painel A, Potenciación y decaimiento post-reposo de contracciones fueron abolidas después de adición de $1 \mu\text{M}$ Ry en preparaciones de los grupos control (C) y gran infarto (LMI), respectivamente. Painel B, substitución de Li^+ por sodio en la potenciación post-reposo intensificada por solución tapón en el grupo C, y conversión de la decaimiento para potenciación en el grupo LMI. * $p < 0.05$ vs. Grupo C, sin intervenciones farmacológicas. # $p < 0,05$ vs. antes de Ry el Li^+ . ANOVA bifactorial y test post hoc de Bonferroni. Los símbolos representan media \pm DEM.

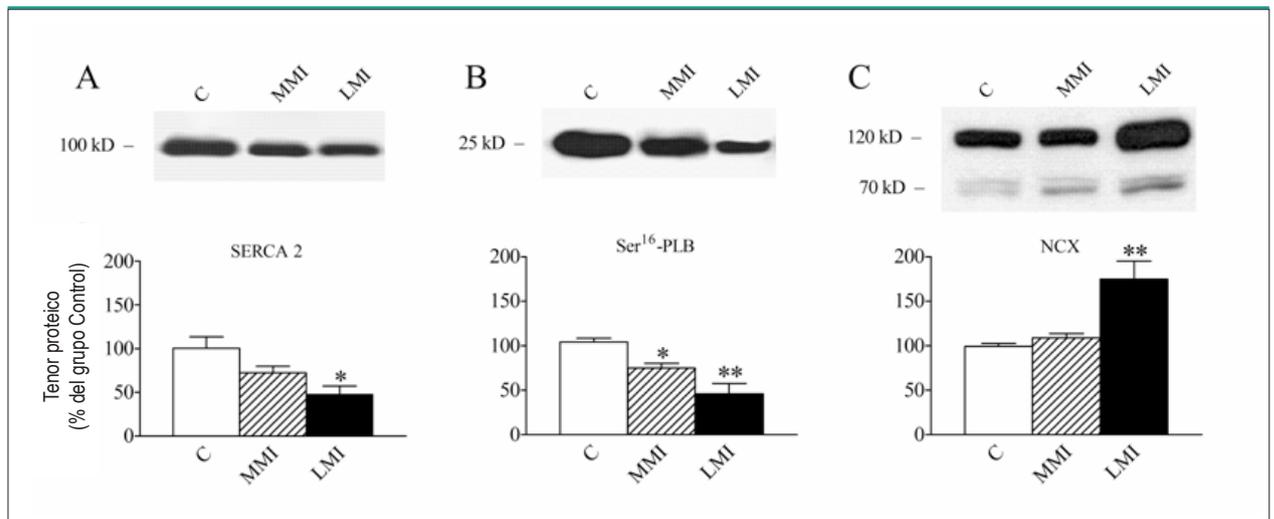


Figura 3 – Tenor proteico de SERCA2, Ser¹⁶-PLB y NCX por Western blotting. Los tenores proteicos de SERCA2 (Painel A) y Ser¹⁶-PLB (Painel B) fueron reducidos en grupos de infarto moderado (MMI, n = 4) y grupos de gran infarto (LMI, n = 4), cuando fueron comparados al grupo control (C, n = 5); hubo superexpresión de NCX (Painel C) apenas en el miocardio del grupo LMI. Los datos (media ± DEM) son expresados como el porcentaje del grupo control. *p < 0,05; **p < 0,01 vs. C; y +p < 0,05 vs. MMI. ANOVA bifactorial y test post hoc de Bonferroni.

Henseleit abolió completamente la potenciación de CPP en el grupo C y la decaimiento de CPP en el grupo LMI (Fig. 2A). Por otro lado, el bloqueo de NCX con una solución de Krebs-Henseleit modificada conteniendo Li⁺ en vez de Na⁺ promovió una ligera mejora en la contracción relativa CPP en el grupo C y restableció el comportamiento normal en el grupo LMI, convirtiendo la decaimiento de CPP para un perfil de potenciación de CPP (Fig. 2B).

Tenor de proteínas por Western blotting

En todos los grupos, fueron investigadas proteínas de manipulación calcio posiblemente envueltas en esas alteraciones (Fig. 3). El remodelado miocárdico después del infarto llevó a una disminución del tenor de SERCA2: aunque el grupo MMI hay presentado disminución moderada de la expresión proteica de SERCA2, fue alcanzada significación apenas en el grupo LMI (Fig. 3A). El PLB total se mostró significativamente reducido tanto en el grupo MMI (79 ± 12% del tenor de C) como en el grupo LMI (65 ± 10% del tenor de C). Su forma fosforilada (Ser¹⁶-PLB) también se presentó reducida en los grupos infartados (Fig. 3B). Aunque el tenor de proteína NCX no se haya alterado en el grupo MMI cuando fue comparado al grupo C, ese mismo tenor se mostró aproximadamente 1,7 vez más significativo en el grupo LMI (Fig. 3C).

Discusión

Nuestros resultados muestran que el remodelado miocárdico post-IM en Ratas puede cambiar la potenciación regular post-reposo para post-decaimiento de la fuerza activa afectando proteínas de manejo del Ca(2+) en miocitos. Ese comportamiento poco común de la mecánica del miocardio se mostró evidente apenas en animales con gran infarto, en los que el proceso de remodelado incluyó no apenas dilatación del VI con disfunción sistólica y diastólica, sino también peor contracción y relajación del miocardio, probablemente por la

deficiencia de captación de SR Ca²⁺ y eflujo excesivo de Ca²⁺ del sarcolema.

Disfunción ventricular en el IM y dilatación de las cavidades cardíacas, normalmente observadas en Ratas con infartos mayores²³, también son mostradas en el presente estudio. El remodelado post-IAM estuvo asociado a la disminución del desarrollo de tensión en los músculos papilares de Ratas infartados y tasa reducida de generación de fuerza y relajación, como fue relatado anteriormente para los músculos papilares^{9,10,13,20,24}. Se identificó también un compromiso similar del acortamiento en miocitos ventriculares aislados^{25,26}, y los mecanismos propuestos para explicar la disfunción contráctil incluyen defectos en el acoplamiento excitación-contracción^{13,24}.

Contracciones post-reposo en el músculo cardíaco

Durante el reposo del miocardio, el Ca²⁺ es removido del citosol para el RS por SERCA2 o para la mitocondria por el uniportador de Ca²⁺, o es expulsado por el NCX y Ca²⁺-ATPasa del sarcolema¹. En los protocolos de CPP como el utilizado en el presente trabajo, la potenciación de la TD ocurre después de una pausa de estímulos, como es esperado para el músculo cardíaco de Ratas. Normalmente, como la mayor parte del Ca²⁺ retorna al RS durante el período de reposo, su tenor tiende a aumentar con la prolongación de la pausa, aumentando también la liberación de Ca²⁺ y, por fin, la generación de fuerza sobre la próxima activación¹. En verdad, la administración de Ry para bloquear la función del RS en los nuestros experimentos abolió completamente la potenciación de los músculos en el grupo C, reforzando estudios anteriores que describen el papel fundamental de la función de almacenamiento del RS en ese fenómeno⁴. Por otro lado, la inhibición de la extrusión de Ca²⁺ por el sarcolema por el NCX en nuestras preparaciones (usando Li⁺) aumentó la potenciación de los músculos C, lo que confirma la importancia de los mecanismos de eflujo de Ca²⁺ para modular negativamente la CPP del músculo del VI de los Ratas^{6,7}. De

hecho, se relató que la estimulación del NCX lleva a un aumento del eflujo de Ca^{2+} y influjo de Na^+ y, consecuentemente, a una disminución de la CPP^{27,28}.

Decaimiento post-reposo en el músculo cardíaco de Ratas

Diversos relatos investigaron el remodelado miocárdico post-infarto y disfunción contráctil, habiendo señalado deficiencia en el movimiento de Ca^{2+} en cardiomiocitos^{13,29-31}. La literatura es controvertida respecto al comportamiento de la CPP en el remodelado post-IM. En miocardios humanos con disfunción, los autores relataron disminución de la potenciación^{32,33} o decaimiento²⁸ de la contracción después de pausas prolongadas. En modelos animales^{9,10}, se observó la disminución de la potenciación en comparación a los controles a partir de Ratas infartados. Además de eso, en miocitos sobrevivientes después de IM en canes, hubo reducción de la potenciación de la contracción después del reposo³⁴. Esas alteraciones fueron atribuidas esencialmente al compromiso de la función de almacenamiento del RS asociado con relativa reducción de la liberación de Ca^{2+} . Recientemente, nuestro grupo identificó decaimiento de la CPP en los músculos papilares de Ratas con insuficiencia cardíaca 40 semanas después de la oclusión coronaria¹⁶. Mientras tanto, los mecanismos causales para ese comportamiento inédito de la CPP en Ratas no fueron investigados, teniendo en vista que el presente estudio utiliza Ratas adultos con infartos curados de seis semanas de edad.

Nuestros experimentos sugieren que las alteraciones del acoplamiento excitación-contracción contribuyen para la reducción de la CPP en los Ratas LMI: la disfunción de almacenamiento del RS asociada con la intensificación de la extrusión de Ca^{2+} , una vez que la Ry abolió este fenómeno, al tiempo que la inhibición de NCX lo normalizó.

El compromiso de la función de reabsorción del RS, lo que probablemente ocurre tanto en el grupo MMI como en el grupo LMI, puede no darse solamente por la disminución de la expresión proteica de SERCA2, sino también por el menor tenor de Ser¹⁶-PLB como muestran los ensayos de Western blotting. Cuando es fosforilada, la proteína reguladora PLB alivia la inhibición de la SERCA2, permitiendo su función de captación de Ca^{2+} ¹. De hecho, la disminución de la fosforilación de PLB en el miocardio remodelado de Ratas infartados también ha sido descrita como llevando a la disfunción del RS³¹. Además de eso, no podemos ignorar la ocurrencia de derramamiento diastólico elevado de Ca^{2+} de las vesículas del RS. Se relata que las proteínas reguladoras receptoras de la Ry (FKBP, en especial, FKBP12.6) pueden ser patológicamente alteradas en su estructura y contenido, así como en los mecanismos de fosforilación que modulan el acoplamiento del receptor FKBP-rianodina, resultando en una subconductancia en el remodelado del miocardio^{29,35}.

Particularmente en los músculos del grupo LMI, usando Li^+ en vez de Na^+ en la solución de Krebs-Henseleit, la decaimiento de la CPP en experimentos realizados en el grupo LMI pasó a constituirse una potenciación típica de la CPP, sugiriendo el papel fundamental del NCX sobre la deficiencia de la contracción subsecuente cuando ocurre decaimiento de la CPP. Como fue mencionado anteriormente, aunque la acumulación de Ca^{2+} en el RS sea relativamente

limitada por el eflujo de Ca^{2+} a través del sarcolema, el RS normalmente reabsorbe la mayor parte del Ca^{2+} como resultado de la absorción dominante de SERCA2 sobre la extrusión de este ión por el sarcolema en cardiomiocitos de Ratas. Por otro lado, si los mecanismos de eflujo de Ca^{2+} por el sarcolema están desempeñando un papel más importante que la reabsorción por el RS, la decaimiento del tenor de Ca^{2+} por el RS tiende a ocurrir con la prolongación de la pausa en conejos²⁷. De hecho, en los mamíferos en que la importancia de la SERCA2 es contrabalanceada por el NCX en la realización de la retirada de Ca^{2+} , como es el caso de los conejos, el miocardio normalmente exhibe esa reducción en la fuerza de la primera contracción siguiente a las restantes, proporcionalmente a la duración de la pausa, designada como decaimiento post-reposo¹. De hecho, nuestros resultados muestran una superexpresión significativa del tenor del NCX en el grupo LMI cuando es comparado a los grupos MMI y C, lo que corrobora la idea que el aumento de la actividad y/o expresión de NCX está relacionado con la decaimiento post-reposo después del IM e insuficiencia cardíaca, por lo menos en los Ratas.

Aunque el miocardio remodelado tanto del grupo MMI como del grupo LMI haya disminuido los tenores de SERCA2 y Ser¹⁶-PLB, se observó elevación del nivel de proteína NCX solamente en el grupo LMI, el grupo experimental que presentó decaimiento post-reposo. Así, el perfil molecular con remodelado post-IM debe ser una variable de fundamental importancia para la ocurrencia de decaimiento post-reposo. De hecho, los cambios en diferentes proteínas de cardiomiocitos fueron relatados en modelos animales^{21,30,36} y humanos con insuficiencia cardíaca^{37,38} como causadoras del acoplamiento disfuncional excitación-contracción. Como resultado, sugerimos que la importancia alterada del eflujo de Ca^{2+} por el sarcolema provocado por la superexpresión de NCX asociada con la captación disfuncional por parte del RS haya, probablemente, llevado al compromiso miocárdico de los Ratas, presentando esa decaimiento de la CPP.

Aunque no hayamos medido directamente el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ o la actividad de las proteínas manipuladoras de calcio analizadas, limitaciones reconocidas en el presente estudio, nuestros resultados sugieren que el compromiso de la función de reabsorción del RS asociado con el aumento de eflujo de calcio durante la diástole del músculo del grupo LMI es la causa probable de la decaimiento de la fuerza post-reposo. Por lo tanto, es posible especular también que menores índices de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ debido al aumento de NCX, aunque puedan reducir la sobrecarga deletérea de Ca^{2+} , pueden disminuir el Ca^{2+} disponible para reabsorción durante la diástole y, consecuentemente, la cantidad liberada durante la sístole.

En suma, nuestros resultados confirmaron que Ratas infartados presentan disfunción ventricular global y también trastornos contráctiles del miocardio resultantes del infarto directamente relacionado a la gravedad del remodelado. Contribuyendo para esa alteración, el uso del protocolo CPP identificó un comportamiento excepcional del miocardio de los Ratas, designado como decaimiento de la fuerza post-reposo. Se atribuye ese fenómeno a un trastorno en las proteínas de manipulación de Ca^{2+} en el ejercicio de sus funciones normales, especialmente en grandes infartos de miocardio, debido a la

asociación de la reducida reabsorción de Ca^{2+} por la SERCA2 con el eflujo excesivo de Ca^{2+} por el NCX.

Potencial Conflicto de Intereses:

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

Referencias

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 Na^{+} - 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 Na^{+} / 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.
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-Augustin 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, Ca^{2+} 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^{+} / Ca^{2+} 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, Rosemblyt 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 Ca^{2+} transport via Na^{+} - Ca^{2+} 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.

Fuentes de Financiación:

El presente estudio no tuvo fuentes de financiación externas.

Vinculación Académica:

No hay vinculación de este estudio a programas de postgrado.

Artículo Original

32. Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G. Ca^{2+} handling and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} 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_i 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. Ca^{2+} -handling proteins and heart failure: novel molecular targets? *Curr Med Chem*. 2003;10(11):967-81.