

EFEITOS DA MONOCROTALINA E DA RESTRIÇÃO CALÓRICA EM PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS UTILIZADOS PARA ANÁLISE DE HIPERTROFIA CARDÍACA

FABRICIO TABELIÃO DEGRANDIS¹; JULIA CASSURIAGA²; FERNANDO MEYER³;
SÉRGIO RAZERA⁴; PAULO CAVALHEIRO SCHENKEL⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – degrandis47@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – juliacassuriaga1@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - fdtmeyer@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – sergiomatos48@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – schenkel.paulo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é um dos subtipos da hipertensão pulmonar e sua classificação tem forte relação com sua origem, podendo ser idiopática, hereditária, induzida por drogas e toxinas e/ou associada a doenças (BARBERÀ et al., 2018). Sabe-se que a hipertrofia cardíaca é a principal causa de morte em pacientes com hipertensão pulmonar (VIZZA et al., 2013; ADUSUMALLI; MAZUREK, 2017).

O tratamento farmacológico da HAP apresenta diversos efeitos colaterais, buscando-se assim alternativas que possam auxiliar. Neste contexto, a restrição calórica (RC) tem se mostrado como uma alternativa interessante, pois é capaz de prevenir o estresse oxidativo e, consequentemente, proteger contra evolução de diversas doenças (MADEO et al., 2019).

Como forma de pesquisar a HAP, o modelo clássico com administração de monocrotalina, tem sido amplamente utilizado por sua fácil indução e reprodutibilidade da HAP em humanos (BUENO-BETI et al., 2018). Apesar dos conhecidos efeitos deletérios da monocrotalina e do potencial cardioprotetor da restrição calórica, temos conhecimento de apenas dois trabalhos em que esses foram testados em ratos e tiveram como desfecho a hipertrofia cardíaca (PRISCO et al., 2021; DING et al., 2015). Salientamos que medidas morfométricas são comumente utilizadas para análise de hipertrofia cardíaca em modelos experimentais (DIGNAM et al., 2022; HAJIALIZADEH et al., 2023). Porém, não há modelos bem estabelecidos na literatura para avaliação desta em animais submetidos a RC e a HAP com monocrotalina.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo principal comparar medidas de hipertrofia cardíaca em ratos Wistar submetidos a restrição calórica e a hipertensão arterial pulmonar com monocrotalina.

2. METODOLOGIA

O projeto teve início após aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPEL (CEUA/UFPEL – nº 038178/2022-03). Os animais deste estudo foram divididos em 4 grupos (n=7/grupo): 1) Controle (C): animais com dieta livre; 2) Restrição calórica: animais com restrição calórica; 3) Monocrotalina (MCT): animais com dieta livre e que receberam monocrotalina; 4) Restrição calórica + MCT (RC+MCT): animais com restrição calórica e que receberam monocrotalina. Após uma semana de adaptação para mensuração do

consumo alimentar médio, a restrição calórica foi realizada de forma escalonada, oferecendo 10% a menos de ração padrão do biotério (NUVILAB®) em relação ao grupo CTRL por semana, até atingir 30% de RC. Portanto, os animais ficaram em RC por 12 semanas, sendo 10 dessas em 30% (DING et al., 2017; DING et al., 2015). No início da nona semana experimental, os animais dos grupos 3 e 4 receberam dose única de monocrotalina (60 mg/kg, i.p.) para indução da HAP, enquanto que os grupos 1 e 2 receberam solução de NaCl 0,9% i.p. no mesmo volume (ZIMMER et al., 2021). Feito isso, eles seguiram recebendo as respectivas dietas e tiveram o peso corporal monitorado por mais três semanas.

Ao término no período experimental, o comprimento cabeça-cauda e cabeça-ânus foram mensurados e os animais foram eutanasiados para mensuração do comprimento da tíbia do membro posterior esquerdo e da hipertrofia cardíaca. Essa foi mensurada de diferentes maneiras: a. peso do coração/peso final do animal (PC/PF) (GEWEHR et al., 2021); b. peso do coração/comprimento cabeça-cauda (PC/CCC) e comprimento cabeça-ânus (PC/CCA); c. peso do coração/comprimento da tíbia (VINKE et al., 2019). Ainda, a hipertrofia do ventrículo direito foi medida através da relação entre o peso do ventrículo direito e o peso do ventrículo esquerdo + septo (VD/VE+Septo) (índice de Fulton) (ZIMMER et al., 2021).

As análises estatísticas foram realizadas usando o *software* GraphPad Prism 6.0 utilizando ANOVA de uma e de duas vias. O pós-teste de Bonferroni foi usado para detectarmos diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os grupos experimentais apresentaram o mesmo peso corporal e comprimento no início do experimento. Já ao final do protocolo experimental, observamos que a restrição calórica atenuou significativamente o crescimento e o ganho de peso dos animais (Tabela 1).

Ao analisarmos o peso do coração inteiro e do ventrículo direito, verificamos que esses não diferiram entre os grupos. Já o ventrículo esquerdo+septo foi menor no grupo RC e no grupo RC+MCT em comparação ao CTRL (Tabela 1).

Tabela 1. Peso, peso do coração, comprimento corporal e comprimento da tíbia

Variável	CTRL	RC	MCT	MCT + RC
Peso Inicial (g)	260 ± 51	270 ± 40	274 ± 44	263 ± 61
Peso Final (g)	458 ± 42	358 ± 21*	442 ± 32	354 ± 27**
Peso coração (g)	1,24 ± 0,17	1,17 ± 0,08	1,37 ± 0,11	1,32 ± 0,33
Peso VD (g)	0,16 ± 0,03	0,15 ± 0,05	0,18 ± 0,04	0,14 ± 0,02
VE + Septo (g)	0,83 ± 0,07	0,67 ± 0,04***	0,83 ± 0,07	0,73 ± 0,14
Comprimento Tíbia (cm)	4,8 ± 0,4	3,8 ± 0,4*	5 ± 0,3	3,4 ± 0,3**
Comprimento Cauda-Cabeça (CCC) (cm)	44,6 ± 1,2	41,4 ± 0,9*	43,5 ± 1,6	40,9 ± 0,8**
Comprimento Cauda-Anus (CCA) (cm)	25,3 ± 1,2	21,9 ± 1,3*	23,9 ± 1,7	21,2 ± 1,3**

*Diferença significativa em relação ao CTRL ($P < 0,0001$); ** Diferença significativa em relação ao MCT ($P < 0,0001$); ***Diferença significativa em relação ao CTRL ($P = 0,0133$)

Os grupos RC e MCT, apesar de terem alterado alguns parâmetros isolados, não resultaram em hipertrofia cardíaca ao analisarmos pelos métodos testados no presente estudo. Já o grupo RC+MCT teve maior hipertrofia pela razão PC/PF e PC/CT quando comparado ao grupo MCT (Tabela 2).

Tabela 2. Índices de hipertrofia cardíaca

Relação	CTRL	RC	MCT	MCT + RC
PC/PF (mg/g)	2,75±0,5	3,25 ±0,3	3,03 ± 0,2	3,6 ± 0,9*
VD/PC (mg/g)	0,34±0,06	0,43 ±0,15	0,39 ± 0,09	0,39 ± 0,08
PC/CT (g/cm)	25,4±3,6	32,64 ± 5,63	28,11 ± 2,52	41,24 ± 11,52**
VD/CT (g/cm)	3,2±20,8	4,2 ± 1,2	3,7 ± 0,9	4,4 ± 0,7
PC/CCA (mg/mm)	4,9±0,7	5,3 ±0,6	5,7 ± 0,4	6,4 ± 1,8
VD/CCA (mg/mm)	0,6±0,1	0,7 ±0,2	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,1
PC/CCC (mg/mm)	2,7±0,3	2,8 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,2 ± 0,9
VD/CCC (mg/mm)	0,3±0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1
VD/VE+Septo (mg/mg)	18,6±3,1	22,9±7,5	21,6±5,1	20,2±5,4

*Diferença significativa encontrada entre RC + MCT vs CTRL ($P = 0,0423$);

**Diferença significativa encontrada em comparação aos grupos MCT ($P = 0,0011$)

A influência da restrição calórica sobre o peso corporal e o comprimento dos animais foi confirmada. Os animais submetidos a restrição calórica apresentaram menor ganho de peso e comprimento. Tem sido mostrado que a redução no peso é benéfica para saúde e parece ser responsável pela cardioproteção promovida por essa dieta (PANG et al., 2022). Contudo, como os índices de hipertrofia levam em consideração esses parâmetros, eles podem mascarar desfechos ou até mesmo gerar um falso positivo.

De forma inesperada, no presente trabalho não observamos influência da monocrotalina sobre a hipertrofia do ventrículo direito. Um fator importante na indução da HAP é o peso e a idade dos animais. Uma vez que eles foram submetidos ao protocolo de restrição calórica por 9 semanas antes de administrarmos a monocrotalina, isso pode ter influenciado no desenvolvimento da doença. Por outro lado, o grupo RC+MCT apresentou maior hipertrofia cardíaca, sugerindo que a restrição calórica prévia pode ser fator que favorece o desenvolvimento da HAP nesses animais.

Análises histológicas já estão sendo realizadas para confirmação dos resultados obtidos com os índices de hipertrofia aqui utilizados.

4. CONCLUSÕES

Análises de hipertrofia cardíaca através de parâmetros morfométricos em modelos experimentais de restrição calórica devem ser observadas com cautela, visto que a restrição pode afetar significativamente o comprimento e peso dos animais. Análises mais profundas devem ser realizadas posteriormente para identificar se há aplicabilidade das relações entre órgãos e medidas de peso e

comprimento dos animais em restrição calórica. Neste sentido, análises histológicas e funcionais são fundamentais

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADUSUMALLI, S.; MAZUREK, J. A. Pulmonary Hypertension Due to Left Ventricular Cardiomyopathy: Is it the Result or Cause of Disease Progression? **Current heart failure reports**, v. 14, n. 6, p. 507, 1 dez. 2017.
- BARBERÁ, J. A. et al. Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension: Summary of Recommendations. **Archivos de Bronconeumología (English Edition)**, v. 54, n. 4, p. 205–215, 1 abr. 2018. Disponível em: <<https://www.archbronconeumol.org/en-guidelines-on-diagnosis-treatment-pulmonary-articulo-S157921291830051X>>.
- BUENO-BETI, C. et al. Pulmonary Artery Hypertension Model in Rats by Monocrotaline Administration. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1816, p. 233–241, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29987824/>>.
- DIGNAM, J. P. et al. Animal models of pulmonary hypertension: Getting to the heart of the problem. **British Journal of Pharmacology**, v. 179, n. 5, p. 811–837, 1 mar. 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bph.15444>>.
- GEWEHR, D. M. et al. Congestive Hepatopathy Secondary to Right Ventricular Hypertrophy Related to Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension. **International Journal of Molecular Sciences** 2021, Vol. 22, Page 11891, v. 22, n. 21, p. 11891, 2 nov. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/21/11891/htm>>.
- HAJIALIZADEH, Z. et al. Protective effects of calorie restriction and 17- β estradiol on cardiac hypertrophy in ovariectomized obese rats. **PLOS ONE**, v. 18, n. 4, p. e0282089, 1 abr. 2023. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0282089>>.
- MADEO, F. et al. Caloric Restriction Mimetics against Age-Associated Disease: Targets, Mechanisms, and Therapeutic Potential. **Cell metabolism**, v. 29, n. 3, p. 592–610, 5 mar. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30840912/>>.
- PANG, L. et al. Caloric restriction-mimetics for the reduction of heart failure risk in aging heart: with consideration of gender-related differences. **Military Medical Research**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35786219/>>.
- VINKE, P. et al. Anti-inflammatory nutrition with high protein attenuates cardiac and skeletal muscle alterations in a pulmonary arterial hypertension model. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019. Disponível em: <pmc/articles/PMC6629640/>.
- VIZZA, C. D. et al. Mode of Death in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 32, n. 4, p. S17–S18, 1 abr. 2013. Disponível em: <<http://www.jhltonline.org/article/S1053249813000387/fulltext>>.
- ZIMMER, A. et al. The progression of pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline is characterized by lung nitrosative and oxidative stress, and impaired pulmonary artery reactivity. **European journal of pharmacology**, v. 891, 15 jan. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33160936/>>.