

ALTERAÇÃO EM PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS CAUSADOS POR MONOCROTALINA E RESTRIÇÃO CALÓRICA EM RATOS WISTAR

FABRICIO TABELIÃO DEGRANDIS¹; STEFANI SOUZA DA SILVA²; WILLIAM ROSHMANN FRANKE³; PAULO CAVALHEIRO SCHENKEL⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – degrandis47@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – stefanisilva6@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – williamfranke2002@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – schenkel.paulo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é um dos subtipos da hipertensão pulmonar que resulta na hipertrofia do ventrículo direito (VD) numa tentativa de adaptação ao aumento da pós-carga, sendo esta a principal causa de morte dos pacientes com hipertensão pulmonar (KIM e colab., 2024). O tratamento farmacológico apresenta diversos efeitos colaterais (CHIN e colab., 2024), 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, conseqüentemente, proteger contra evolução de diversas doenças como, por exemplo, a síndrome metabólica, diversos tipos de câncer, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (JAMES e colab., 2024). Como forma de pesquisar a HAP, o modelo clássico com administração de monocrotalina, um alcalóide pirrolizidina macrocíclico presente em *Crotalaria*, tem sido amplamente utilizado por sua fácil indução e reprodutibilidade da HAP em humanos (ZHONG e colab., 2024; ZIMMER e colab., 2021).

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 (BALSA e colab., 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 (RC): 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., 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 os grupos 1 e 2 receberam solução de NaCl 0,9% i.p. no mesmo volume (ZIMMER e colab., 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 e colab., 2021); b. peso do coração/comprimento cabeça-cauda (PC/CCC) e comprimento cabeça-ânus (PC/CCA); c. peso do coração/comprimento da tíbia (VINKE e colab., 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). Análises histológicas foram realizadas para determinar os valores do tamanho de área dos cardiomiócitos bem como espessura da parede e porcentagem da espessura da parede medial do pulmão.

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 corporal, peso do coração, comprimento corporal e comprimento da tíbia de ratos Wistar submetidos à restrição calórica e/ou hipertensão arterial pulmonar

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, bem como não mostraram diferenças nas análises histológicas realizadas (tabela 2). Já o grupo RC+MCT teve maior hipertrofia pela razão PC/PF e PC/CT quando comparado ao grupo MCT, porém isto não foi confirmado ao se analisar as evidências histológicas sobre hipertrofia cardíaca (área de cardiomiócitos), bem como sem danos endoteliais na parede pulmonar (espessura da parede e porcentagem da espessura da parede medial do pulmão)

Tabela 2: Índices de hipertrofia cardíaca e análises histológicas de ratos Wistar submetidos à restrição calórica e/ou hipertensão arterial pulmonar

Variável	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/VE+Septo (mg/mg)	18,6±3,1	22,9±7,5	21,6±5,1	20,2±5,4
Espessura da parede pulmonar(μm)	24±3,8	21,8 ± 2,6	20,8 ± 5,6	22,6 ± 6,4
Porcentagem da espessura da parede medial (%)	17,4±4,3	13,9 ± 3,1	14,4 ± 5,5	16,9 ± 5,3
Área do cardiomiócito (μm ²)	362,1±58	319,6±72,6	388±112,9	266,6±38,2

*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 (ZHANG e colab., 2024). Contudo, como os índices de hipertrofia levam em consideração esses parâmetros, eles podem mascarar desfechos ou até mesmo gerar um falso positivo. Ademais, parâmetros histológicos analisados não apresentaram diferença significativa. De forma inesperada, no presente trabalho não observamos influência da monocrotalina sobre a hipertrofia do ventrículo direito. As análises histológicas confirmam estes achados. 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.

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 realizadas no presente trabalho são necessárias para confirmação de achados em modelos experimentais

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALSA, André e ADÃO, Rui e BRÁS-SILVA, Carmen. **Therapeutic Approaches in Pulmonary Arterial Hypertension with Beneficial Effects on Right Ventricular Function—Preclinical Studies**. International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 21, p. 15539, 1 Nov 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/24/21/15539/htm>>

CHIN, Kelly M. e colab. **Treatment algorithm for pulmonary arterial hypertension**. European Respiratory Journal, 29 Ago 2024. Disponível em: <<https://erj.ersjournals.com/content/early/2024/08/01/13993003.01325-2024>>

GEWEHR, Douglas Mesadri e colab. **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.

JAMES, Dara L. e colab. **Impact of Intermittent Fasting and/or Caloric Restriction on Aging-Related Outcomes in Adults: A Scoping Review of Randomized Controlled Trials**. Nutrients, v. 16, n. 2, 1 Jan 2024.

KIM, Sujin e colab. **Survival rate and death risk for associated pulmonary arterial hypertension: A retrospective population-based study**. Precision and Future Medicine, v. 8, n. 1, p. 2–9, 31 Mar 2024.

VINKE, Paulien e colab. **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.

ZHANG, Hui e colab. **Effects of Different Caloric Restriction Patterns on Blood Pressure and Other Cardiovascular Risk Factors: A Systematic Review and Network Meta-Analysis of Randomized Trials**. Nutrition Reviews, 10 Set 2024. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/nutrit/nuae114>>

ZHONG, Yan Fen e colab. **The Correlation between Lung Ultrasound and Pathology in Rat Model of Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension**. Canadian Respiratory Journal, v. 2024, n. 1, p. 6619471, 1 Jan 2024. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2024/6619471>>

ZIMMER, Alexandra e colab. **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, p. 173699, 15 Jan 2021a.