

4.09.99 – Educação Física.

## POTENCIAL PREVENTIVO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO NA CAPACIDADE FÍSICA E ESTRUTURA MUSCULAR ESQUELÉTICA EM MODELO MURINO DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Carrascoza, L.S<sup>1\*</sup>, Bacurau, A.V<sup>2</sup>, Vieira, J.S<sup>3</sup>, Brum, P.C<sup>4</sup>

1. Graduando da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP)
2. Pesquisadora de nível Pós-Doutorado da Faculdade de Educação Física e Esporte da USP
3. Pesquisadora em nível Mestrado da Faculdade de Educação Física e Esporte da USP
4. Professora da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo

### Resumo

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica associada à miopatia esquelética caracterizada por disfunção contrátil, atrofia muscular esquelética e rarefação capilar (1). A miopatia esquelética está associada a um pior prognóstico e o treinamento físico aeróbico (TFA) é uma terapia eficaz em melhorar a função do músculo esquelético (ME) e a qualidade de vida (2). O presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial preventivo do TFA na capacidade aeróbica, capilarização e massa muscular esquelética em modelo murino de IC por hipertensão pulmonar que afeta inicialmente a função do ventrículo direito (VD) e posteriormente o esquerdo (VE). Para isso, realizamos um protocolo de TFA, seguido de análises histológicas, de função e estrutura muscular esquelética. O resultado aponta que o TFA foi capaz de melhorar parâmetros cardiovasculares, principalmente a função contrátil cardíaca e a tolerância aos esforços, além de atenuar a atrofia muscular das fibras do tipo II (glicolíticas). Dessa forma, o TFA é uma estratégia terapêutica eficaz em atenuar a miopatia esquelética na IC associada a disfunção do VD.

**Autorização legal:** Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esporte da USP – protocolo de pesquisa n° 2014/03.

**Palavras-chave:** Músculo Esquelético; Monocrotalina; Hipertensão Pulmonar.

**Apoio financeiro:** CNPq e FAPESP.

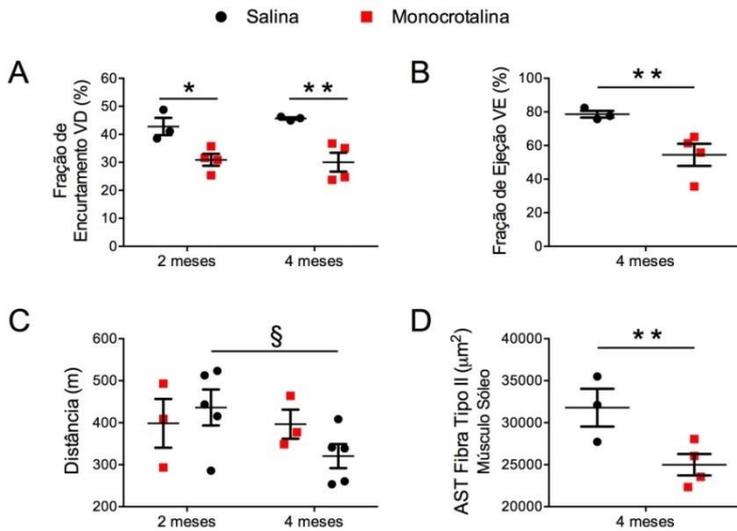
**Trabalho selecionado para a JNIC:** EEFE-USP.

### Introdução

A IC uma síndrome clínica complexa, resultante do comprometimento estrutural ou funcional do coração, sendo a via final comum da maioria das cardiomiopatias e de outras doenças do sistema circulatório (3). De acordo com o 1º Registro Brasileiro de Insuficiência Cardíaca- a IC é responsável por 21% do total de mortes por doenças cardiovasculares no Brasil e estima-se que haverá um aumento de 30% em seus casos até 2030 (4). Apesar de alterações no sistema cardiovascular serem cruciais para o desenvolvimento da IC, esta síndrome também afeta o músculo esquelético, o que ajuda a explicar o quadro de intolerância aos esforços físicos (5). Dessa forma, é crescente o número de trabalhos que buscam entender o envolvimento da musculatura esquelética na intolerância ao esforço observada na IC, bem como a contribuição dessas alterações para a progressão da síndrome.

O TFA tem se mostrado uma estratégia não farmacológica importante no tratamento da IC, por promover melhora na tolerância aos esforços e na qualidade de vida de pacientes (6). Tal resposta vem sendo relacionada em parte, ao menor comprometimento do tecido muscular esquelético (6). No entanto, os mecanismos envolvidos nessa melhora não são completamente conhecidos. Dessa forma, estudos em modelos experimentais robustos, e com menor mortalidade e variabilidade são importantes.

A monocrotalina (MCT) é utilizada em modelos experimentais para induzir IC pelo aumento da pós-carga no ventrículo direito (VD) resultante da hipertensão pulmonar. Estudo prévio do nosso laboratório demonstrou que 4 meses de tratamento com MCT em camundongos induziu sinais de IC como disfunção do VD e intolerância ao esforço, associados a atrofia e disfunção do ME (Figura 1) configurando um modelo robusto de IC associada a disfunção do VD. Assim, esse estudo tem como objetivo avaliar o potencial preventivo do TFA na capacidade aeróbica, capilarização e massa muscular em modelo murino de IC induzida por hipertensão pulmonar.

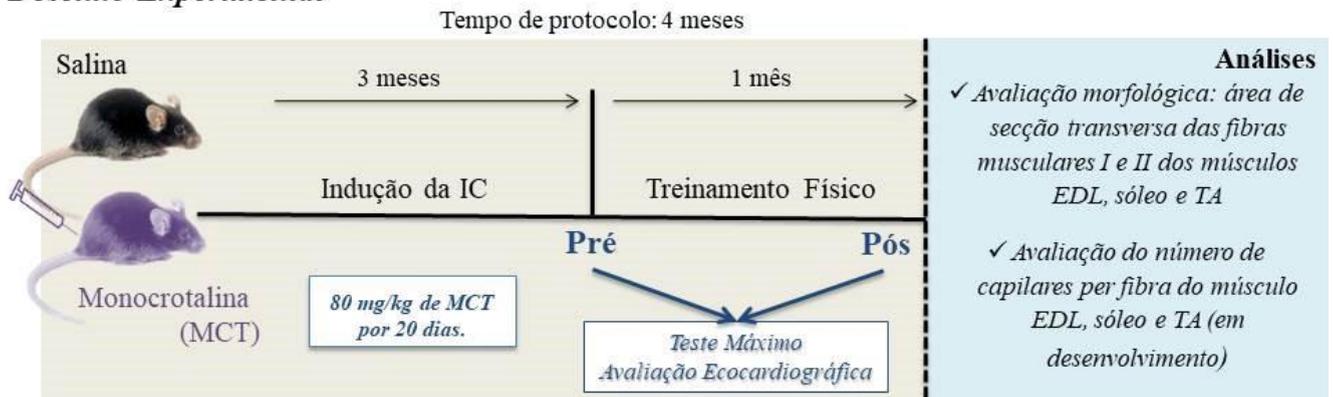


**Figura 1:** (A) fração de encurtamento do ventrículo direito (VD); (B) fração de ejeção do ventrículo esquerdo (VE); (C) distância percorrida; e (D) área de seção transversal (AST) das fibras tipo II do músculo sóleo de camundongos tratados com salina (círculos pretos) ou monocrotalina (doses a cada 20 dias de 80mg/kg, representados pelos I quadrados vermelhos). Os dados estão representados na forma de média  $\pm$  erro padrão da média. \* vs. salina 2 meses,  $p < 0,05$ ; \*\* vs. salina 4 meses,  $p < 0,01$ ; § vs. monocrotalina 2 meses,  $p < 0,01$ . Para as figuras A e C os dados foram comparados entre os grupos pela ANOVA de dois caminhos (tratamento vs. tempo) com medidas repetidas (tempo), com post-hoc de Sidak; Para as figuras de C-E os dados foram analisados pelo teste  $t$  de Student para dados não pareados.

## Metodologia

O desenho experimental está apresentado na Figura 2.

### Desenho Experimental



**Figura 2. Desenho Experimental:** Foram utilizados camundongos C57BL6/J machos aos 3 meses de idade, divididos em 4 grupos salina sedentário e MCT sedentário (80mg/kg, i.p., a cada 20 dias por 4 meses) e salina treinado e MCT treinado (esteira rolante, 4 semanas, 5x/semana, 1h a 60% da velocidade máxima atingida em teste progressivo escalonado até a exaustão, TesteM). O TesteM e o exame ecocardiográfico foram avaliados após 3 meses de tratamento (MCT ou salina), e reavaliados após o período experimental (1 mês). A área de seção transversal (AST) das fibras do tipo I e II e a densidade capilar dos músculos sóleo, tibial anterior e EDL foram avaliados por imunofluorescência para MHC/laminina e CD31, respectivamente. As variáveis estudadas foram comparadas entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (doença e treinamento), com *Post-hoc* de Tukey, apresentadas na forma de média  $\pm$  erro padrão da média. Foi adotado como nível de significância  $p \leq 0,05$ .

**Amostra.** Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6J entre 3-7 meses de idade mantidos no biotério da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP), com temperatura controlada entre 22 e 25°C, em ciclo claro-escuro invertido em 12:12 horas, com início do período escuro às 7 horas da manhã e início do período claro às 19 horas, no total de 5 animais por caixa. Água e comida foram administradas *ad libitum*. Após o término do período experimental, os animais foram anestesiados e mortos para extração dos tecidos. Em cada procedimento utilizamos um número amostral entre 8 e 10 animais por grupo.

**Indução de hipertensão pulmonar e insuficiência cardíaca.** Foram administradas a cada 20 dias injeções intraperitoneais de 80mg/kg de MCT, no volume de 5 $\mu$ l/g, como descrito por Li anteriormente (7). Os animais do grupo controle receberam solução salina nas mesmas condições.

**Avaliação da função cardíaca.** O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado por um único observador, cego para os grupos. A função contrátil cardíaca foi avaliada em modo M.

**Avaliação da capacidade física.** A tolerância ao esforço foi avaliada por meio de teste progressivo até a exaustão de acordo com protocolo desenvolvido por Ferreira et al.(8).

**Treinamento físico aeróbico.** O TFA foi realizado em intensidade moderada com predomínio de metabolismo aeróbico, conforme padronizado anteriormente em nosso laboratório (8).

**Análises histológicas.** - Após os devidos procedimentos metodológicos de preparação do corte e etapas de imunofluorescência. A captura das imagens foi realizada em computador acoplado a um microscópio de fluorescência e conectado a um sistema fotográfico (Leica Qwin, Alemanha). Para a tipagem de fibras foram

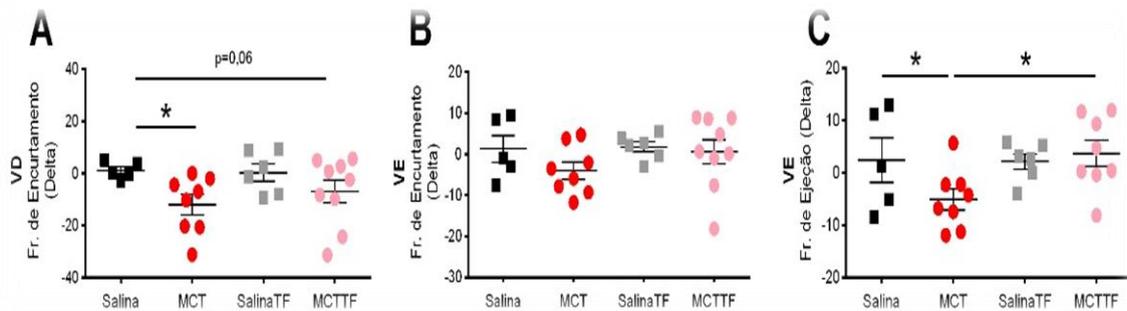
usados os anticorpos primários: 1-Laminina (delimitação das fibras); 2-MHCI (fibras tipo I); e 3- MHCIIA (fibras tipo IIA). Para a avaliação da capilarização: 1-Laminina (delimitação das fibras); 2-CD31 (capilares).

**Análise estatística:** As variáveis estudadas foram comparadas entre os grupos pela análise de variância de dois caminhos (doença e treinamento), com *post-hoc* de Tukey, apresentadas na forma de média  $\pm$  erro padrão da média. Foi adotado como nível de significância  $p < 0,05$ .

### Resultados e Discussão

O efeito do TF é pouco conhecido em modelo de IC induzida por MCT. Além do mais, até o momento, não foram realizados estudos sobre o efeito do TF em modelo murino de IC por MCT e, portanto, os resultados apresentados neste presente projeto são inéditos.

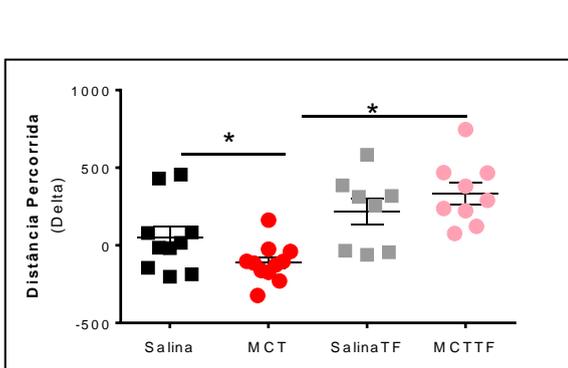
Como podemos observar na Figura 3, o grupo MCT apresentou menor fração de encurtamento no VD e menor fração de ejeção do VE quando comparado ao grupo Salina sedentário. O TFA atenuou a disfunção contrátil no VE de animais MCT.



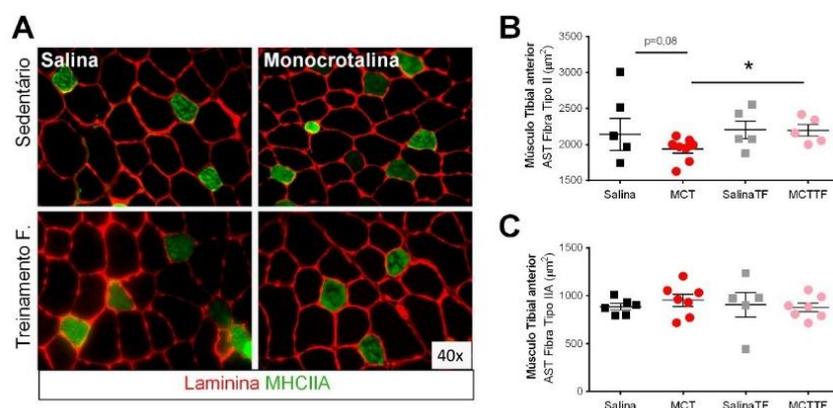
**Figura 3: Efeito do treinamento físico aeróbico nas mudanças funcionais e estruturais desencadeadas pelo tratamento com monocrotalina no músculo cardíaco.** Diferença (pos-pre) da fração de encurtamento do ventrículo direito (A), esquerdo (B), e da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (C). Os dados foram comparados pela ANOVA de dois caminhos com *post-hoc* de Tukey. \* diferença significativa vs. grupo indicado pelo traço,  $p < 0,05$ . MCT, monocrotalina; TF, treinamento físico.

Foi possível constatar o benefício de adaptação ao TFA maior no VE, do que observado no VD. Esse resultado era esperado, pois adaptações no ventrículo direito normalmente só são observadas após longos períodos de TF aeróbico, uma vez que esta cavidade recebe uma menor sobrecarga de trabalho durante o exercício, quando comparado ao esquerdo.

Como observado nas figuras 4 e 5, o TFA melhorou a tolerância ao esforço físico nos animais MCT ( $P=0,002$ ; Figura 4). Essa melhora foi acompanhada pelo aumento da área de secção transversa das fibras do tipo II do músculo tibial anterior, comparando o grupo MCTTF (Figura 5B) percebe-se que ele se equipara ao grupo salina sedentário. Esse resultado merece destaque, pois demonstra a importância do tecido muscular no quadro de intolerância ao esforço físico, sinal clássico da IC, e o impacto do TFA. De fato, o TFA é considerado a intervenção mais significativa em contrapor os efeitos da IC no tecido muscular esquelético. Portanto, corroborando os modelos experimentais de IC, o modelo de IC induzida por MCT em camundongos, se faz uma importante ferramenta para o estudo das alterações musculares advindas da IC associada ao VD, bem como o efeito do TF em contrapor essas alterações.

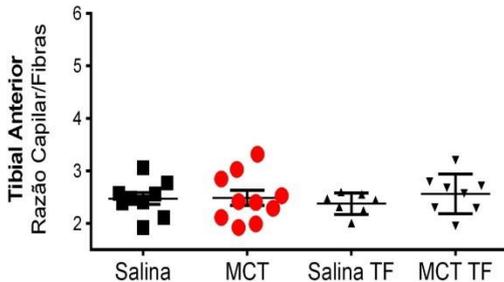


**FIGURA 4. Efeito do treinamento físico aeróbico nas mudanças funcionais desencadeadas pelo tratamento com monocrotalina no músculo esquelético:** Diferença (pre-pos) da distância percorrida em teste de tolerância ao esforço físico. Os dados foram comparados pela ANOVA de dois caminhos com *post-hoc* de Sidak. \* diferença significativa vs. grupo indicado pelo traço,  $p < 0,05$ . MCT, monocrotalina; TF, treinamento físico.



**FIGURA 5. Efeito do treinamento físico aeróbico nas mudanças estruturais desencadeadas pelo tratamento com monocrotalina no músculo esquelético.** Painel representativo com as marcações por imunofluorescência para fibras do tipo IIA (MHC IIA, verde) no músculo tibial anterior, e laminina (marcação do sarcolema, vermelha) (A). Área de secção transversa (AST) das fibras do tipo II (B) e IIA (C) do músculo tibial anterior de animais tratados com salina e monocrotalina, sedentários e treinados. Os dados foram comparados pela ANOVA de dois caminhos com *post-hoc* de Sidak. \* diferença significativa vs. grupo indicado pelo traço,  $p < 0,05$ . MCT, monocrotalina; TF, treinamento físico.

Apesar desses resultados, não foi encontrada nenhuma diferença significativa no que se refere a capilarização. A Figura 6 demonstra que não foram encontrados resultados significativos na razão capilar/fibra do músculo tibial anterior. Supomos que isso ocorra devido ao período de TFA (30 dias), o que talvez não seja suficiente para acarretar tais alterações.



**Figura 6. Tipagem de fibras e Razão capilar por fibra do músculo EDL de animais tratados com monocrotalina.** Razão capilar por fibra do músculo EDL de camundongos tratados com salina ou monocrotalina, (submetidos ou não a TFA). Os dados estão representados na forma de média  $\pm$  erro padrão da média. Os dados foram analisados pelo teste t de Student para dados não pareados. \*diferença significativa vs. salina,  $p < 0.05$ .

## Conclusões

Corroborando os achados de nosso laboratório em outros modelos de IC, a IC induzida por hipertensão pulmonar pelo uso de MCT tem o potencial de induzir IC acarretando miopatia esquelética. Esse estudo reforça o papel do treinamento físico aeróbico como uma importante terapia não farmacológica no tratamento da miopatia esquelética induzida pela IC, demonstrando que essa resposta se estende á IC associada ao VD.

## Referências bibliográficas

1. Clyde, W. et al. 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure. Journal of the American College of Cardiology, 2013. 62.
2. Willenheimer, R., et al. Effects on quality of life, symptoms and daily activity 6 months after termination of an exercise training programme in heart failure patients. Int J Cardiol, 2001. 77: p. 25-31.
3. Clyde, W. Yancy, M., MSc, FAHA, Chairyz; et al; 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure. Journal of the American College of Cardiology, 2013. 62.
4. I Registro Brasileiro de Insuficiência Cardíaca – Aspectos Clínicos, Qualidade Assistencial e Resfechos Hospitalares. 2013
5. Bogghi, E.A., et al., [Brazilian Guidelines on Chronic Heart Failure]. Arq Bras Cardiol, 2009. 93 (1 Suppl 1): p. 3-70.
6. Willenheimer, R., et al., Effects on quality of life, symptoms and daily activity 6 months after termination of an exercise training programme in heart failure patients. Int J Cardiol, 2001. 77: p. 25-31.
7. Li, L., et al., Innibition of nuclear factor-kappa $\beta$  in the lungs prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in mice. Hypertension, 2014. 63: p. 1260-9.
8. Ferreira, J.C. et al., Maximal lactate state in running mice: effect of exercise training. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007. 34: p. 760-5.