

4.08.99 - Fisioterapia e Terapia Ocupacional

INDICADORES MORFOLÓGICOS DE REMODELAÇÃO CARDÍACA EM RATOS SUBMETIDOS A ALIMENTAÇÃO INTERMITENTE E EXERCÍCIO FÍSICO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE

Maria Lua M. Mendonça^{1*}, Jéssica Maria L. Oliveira², Marianna Rabelo de Carvalho¹, Luana Urbano Pagan³, Marina Politi Okoshi⁴, Silvio Assis de Oliveira Júnior⁵, Paula Felipe Martinez⁶

1. Aluna do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste (UFMS)
2. Aluna de Iniciação Científica do Curso de Fisioterapia - Instituto Integrado de Saúde (INISA) – UFMS
3. Aluna de Pós-doutorado - Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) – UNESP
4. Professor Adjunto da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) – UNESP
5. Professor do Curso de Fisioterapia - Instituto Integrado de Saúde (INISA) – UFMS
6. Professor do Curso de Fisioterapia - Instituto Integrado de Saúde (INISA) – UFMS/Orientador

Resumo

INTRODUÇÃO: Exercício intervalado de alta intensidade (HIIT) e alimentação intermitente promovem alterações morfológicas cardíacas. **OBJETIVO:** avaliar a influência da associação entre alimentação intermitente e HIIT sobre indicadores morfológicos de remodelação cardíaca em ratos. **MÉTODOS:** Para tanto, ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos. Os grupos C e Ex foram alimentados diariamente *ad libitum* com ração comercial para roedores. Já os grupos AI e EAI receberam a mesma ração, administrada à vontade em dias alternados. Os grupos EX e EAI foram submetidos a protocolo de HIIT em esteira rolante 5x/semana, por 12 semanas. Posteriormente, cortes histológicos do ventrículo esquerdo foram utilizados para análise morfométrica microscópica. **CONCLUSÃO:** O HIIT, isoladamente, promove hipertrofia de cardiomiócitos e fibrose intersticial no miocárdio. A AI atenua as alterações morfológicas cardíacas induzidas pelo exercício.

Autorização legal: O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (protocolo nº 778/2016).

Palavras-chave: Exercício Físico, Jejum Intermitente, Coração.

Trabalho selecionado para a JNIC: UFMS

Introdução

O sedentarismo e os maus hábitos alimentares são características marcantes da sociedade moderna e um grande desafio para a saúde pública, pois contribuem para o desenvolvimento e agravamento de doenças crônicas, dentre as quais se destacam as afecções cardiovasculares (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Nesse contexto, busca-se reduzir e prevenir tais doenças, o exercício intervalado de alta intensidade (HIIT) e a alimentação intermitente (AI) tem se destacado devido aos seus diversos benefícios à saúde.

O HIIT caracteriza-se por exercício de alta intensidade intercalados por períodos de recuperação passiva ou ativa de baixa intensidade (GIBALA, JONES, 2013). Sua prática pode estimular, em animais de experimentação saudáveis, o aumento do comprimento, da largura e do volume dos cardiomiócitos, além do aumento da massa dos ventrículos esquerdo e direito (KEMI *et al.*, 2004). Já em modelos de doença, o HIIT foi associado a redução da fibrose e da hipertrofia ventricular no infarto. Por outro lado, a AI constitui intervenção nutricional com períodos alternados de privação alimentar e realimentação *ad libitum*, geralmente em ciclos de 12 a 24 horas. Em modelos de agressão cardíaca, a AI promoveu redução do tamanho do infarto e da remodelação do ventrículo esquerdo (AHMET *et al.*, 2005). Além disso, a AI destaca-se por estar associada ao aumento da longevidade e à redução do risco de doenças crônicas, como as afecções cardiovasculares (MATTSON *et al.*, 2017). No entanto, há necessidade de estudos que verifiquem os efeitos da associação dessas intervenções no coração. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a influência da associação entre a alimentação intermitente e o exercício físico intervalado de alta intensidade sobre a morfologia cardíaca de ratos.

Metodologia

Delineamento experimental

Foram utilizados 48 ratos Wistar machos, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (INBIO/UFMS). Os animais foram mantidos em ambiente e temperatura controlados e aleatoriamente distribuídos em quatro grupos: Controle (C), Alimentação Intermitente (AI), Exercício Físico Intervalado de Alta Intensidade (EX) e Exercício Físico Intervalado de Alta Intensidade e Alimentação Intermitente (EAI). Os grupos C e EX foram tratados diariamente com ração *ad libitum*, já os animais dos grupos AI e EAI receberam a mesma ração padrão, administrada *ad libitum* em dias alternados com dias de jejum total. O consumo de ração foi controlado diariamente e a massa corporal dos animais foi mensurada semanalmente. Os grupos EX e EAI foram submetidos a protocolo de corrida em esteira rolante (MOREIRA *et al.*, 2013). O período do experimento foi de 12 semanas. Todos os procedimentos foram realizados conforme o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*”, publicado pelo “U. S. National Institute of Health”.

Teste de esforço e protocolo de exercício intervalado de alta intensidade

Para verificar a capacidade funcional, foi realizado teste de esforço máximo, utilizando-se protocolo incremental para ratos com o propósito de determinar a velocidade máxima alcançada ($V_{m\acute{a}x}$). Posteriormente, foi iniciado o protocolo de exercício, que consistiu em cinco sessões semanais de exercício físico em esteira rolante a 15° de inclinação, com duração de 49 min cada (3 min a 60% $V_{m\acute{a}x}$ e 4 min a 85% $V_{m\acute{a}x}$), com aquecimento de 10 min a 40% $V_{m\acute{a}x}$ antes de cada sessão. (MOREIRA *et al.*, 2013).

Eutanásia e coleta de tecidos

Ao final do experimento, os animais foram submetidos a anestesia intraperitoneal com tiopental (80 mg/kg) e eutanásia por decapitação. Átrios, ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE) foram dissecados e pesados separadamente. Tecido adiposo dos compartimentos epididimal e retroperitoneal também foram removidos e pesados (OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2014).

Análise da morfologia macroscópica e microscópica do coração

Para análise cardíaca macroscópica foram consideradas: razões entre massa dos átrios, VD, VE, massa total do coração pelo comprimento da tibia. Amostras anelares de VE (7 μ m de espessura) foram coletadas em lâminas histológicas e corados com solução de hematoxilina-eosina para a avaliação morfométrica de cardiomiócitos ou corados pela técnica de *Picrosirius Red* para quantificação da fração intersticial de colágeno (MARTINEZ *et al.*, 2011; OLIVEIRA JÚNIOR *et al.*, 2014).

Análise estatística

Os dados foram apresentados em medidas descritivas de posição e variabilidade. Para comparação entre grupos, foi realizada análise de variância de duas vias (ANOVA) complementada com teste de Tukey. O nível de significância considerado foi de 5%.

Resultados e Discussão

Em relação às variáveis obtidas no teste de esforço máximo, a distância percorrida (C: 242,2 \pm 73,4; AI: 281,2 \pm 66,5; EX: 687,0 \pm 98,5; EAI 851,2 \pm 180,3 m) e a velocidade máxima alcançada durante o teste (C: 20,7 \pm 3,2; AI: 22,5 \pm 2,7; EX: 35,7 \pm 2,7; EAI: 39,7 \pm 4,8 m/min) foram maiores no grupo EX que no grupo C e maiores no grupo EAI que nos grupos EX e AI.

Na tabela 1, estão expostos os dados nutricionais. As variáveis ingestão alimentar total, ingestão calórica total e eficiência alimentar total foram menores nos grupos EX e AI quando comparados ao C e menores no grupo EAI que no grupo EX.

Tabela 1. Variáveis nutricionais

Variáveis	Grupos			
	C (n=12)	AI (n=12)	EX (n=12)	EAI (n=12)
Ingestão Alimentar Total (g)	2,217 \pm 129	1,627 \pm 105*	2,070 \pm 132*	1,599 \pm 105†
Ingestão Calórica Total (Kcal)	8,006 \pm 466	5,875 \pm 381*	7,473 \pm 137*	5,774 \pm 380†
Eficiência Alimentar Total (%)	1,79 \pm 0,45	1,42 \pm 0,23*	1,16 \pm 0,33*	1,14 \pm 0,43†

C: Controle; AI: Alimentação Intermitente; EX: Exercício; EAI: Exercício Alimentação Intermitente; Média \pm desvio padrão; *p<0,05 vs. C; † p<0,05 vs. EX; ANOVA e Tukey.

Na tabela 2, são exibidas as variáveis de morfologia cardíaca macroscópica. A massa dos átrios, em valores absolutos e normalizada pelo comprimento da tibia, foi menor no grupo EAI quando comparado ao grupo EX. A massa do ventrículo esquerdo, em valores absolutos, foi menor no grupo AI que no grupo C. A massa do ventrículo direito e total do coração e as razões VD/tibia e coração/tibia foram menores nos grupos AI e EAI quando comparados aos seus respectivos controles, C e EX.

Tabela 2. Morfologia cardíaca macroscópica

Variáveis	Grupos			
	C (n=12)	AI (n=12)	EX (n=12)	EAI (n=12)
Átrios (g)	0,07 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01†
Átrios/Tibia (mm/mg)	1,16 \pm 0,21	1,58 \pm 0,26	1,84 \pm 0,34	1,54 \pm 0,17†
VE (g)	0,54 \pm 0,09	0,47 \pm 0,07*	0,54 \pm 0,06	0,48 \pm 0,03
VE/Tibia (mg/mm)	12,7 \pm 1,9	11,6 \pm 1,7	12,9 \pm 1,3	11, 8 \pm 0,7
VD (g)	0,18 \pm 0,03	0,15 \pm 0,02*	0,18 \pm 0,01	0,16 \pm 0,02†
VD/Tibia (mg/mm)	4,30 \pm 0,54	3,62 \pm 0,43*	4,21 \pm 0,34	3,81 \pm 0,35†
Coração (g)	0,79 \pm 0,10	0,68 \pm 0,08*	0,79 \pm 0,06	0,70 \pm 0,04†
Coração/Tibia (mg/mm)	18,6 \pm 2,1	16,8 \pm 1,8*	18,9 \pm 1,2	17,1 \pm 0,8†

C: Controle; AI: Alimentação Intermitente; EX: Exercício; EAI: Exercício Alimentação Intermitente; Média \pm desvio padrão; * p<0,05 vs. C; † p<0,05 vs. EX; ANOVA e Tukey.

Na tabela 3, estão descritas as variáveis murinométricas. A massa corporal foi menor nos grupos EX e AI quando comparados ao grupo C e menor no grupo EAI em relação ao grupo EX. O índice de Lee foi menor no grupo EX que no grupo C. A adiposidade foi menor no grupo EX quando comparado ao grupo C; entretanto, em relação ao grupo EAI, o grupo EX apresentou maior adiposidade. As gorduras epididimal e retroperitoneal dos

grupos EX e AI detiveram menores valores quando comparados ao grupo C; já o grupo EAI apresentou menores valores para estas variáveis quando comparado ao EX.

Tabela 3. Variáveis murinométricas

Variáveis	Grupos			
	C (n=12)	AI (n=12)	EX (n=12)	EAI (n=12)
Massa Corporal Final (g)	419 ± 45	337 ± 40*	359 ± 31*	324 ± 33†
Índice de Lee (g/cm ³)	0,29 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,28 ± 0,01*	0,29 ± 0,01
Adiposidade (%)	3,6 ± 1,0	3,0 ± 0,9	2,4 ± 0,5*	1,9 ± 0,4‡
Gordura Epididimal (g)	8,1 ± 2,5	5,8 ± 1,7*	5,4 ± 1,4*	3,9 ± 0,8†‡
Gordura Retroperitoneal (g)	7,0 ± 3,0	4,5 ± 2,2*	3,4 ± 0,8*	2,3 ± 0,6‡

C: Controle; AI: Alimentação Intermitente; Ex: Exercício; EAI: Exercício Alimentação Intermitente; Média ± desvio padrão; * p<0,05 vs. C; † p<0,05 vs. EX; ‡ p<0,05 vs. AI; ANOVA e Tukey.

Em relação à morfologia cardíaca microscópica (figura 1), a área seccional transversa dos cardiomiócitos (C: 151±9,8; AI: 100±6,5; EX: 170±15; EAI:103±3,9 μm²) foi menor no grupo AI quando comparado ao grupo C e maior no grupo EX que nos grupos C e EAI. A fração intersticial de colágeno (C: 3,06±1,06; AI: 2,33±0,55; EX: 4,60±0,65; EAI: 3,19±1,00 %) foi maior no grupo EX em relação aos grupos C e EAI e maior em EAI que no grupo AI.

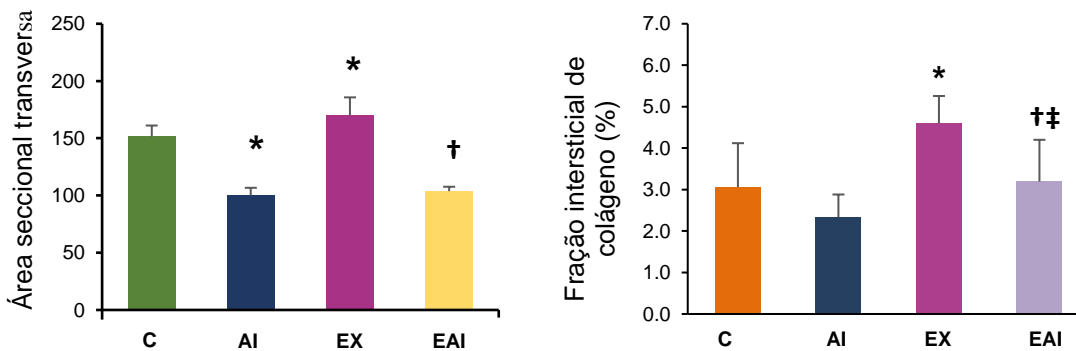


Figura 1. Valores referentes à (A) área seccional transversa dos cardiomiócitos e à (B) fração intersticial de colágeno no miocárdio. C: Controle; AI: Alimentação Intermitente; EX: Exercício; EAI: Exercício Alimentação Intermitente. Valores em média ± desvio padrão. ANOVA e Tukey. * p<0,05 vs. C; † p<0,05 vs. EX; ‡ p<0,05 vs. AI. ANOVA de duas vias e Tukey.

Como principais resultados, verificamos que o HIIT promove alterações morfológicas no músculo cardíaco e que alimentação intermitente, de forma isolada e quando associada ao exercício, reduz a fibrose no miocárdio. Em relação ao teste de esforço, os grupos exercitados alcançaram melhor desempenho funcional quando comparados aos respectivos controles, possivelmente por conta de adaptações funcionais geradas a partir do exercício aeróbio intervalado de alta intensidade. ASTORINO *et al.* (2012) sugerem que o exercício intervalado de alta intensidade aumenta o consumo máximo de oxigênio (VO_{2Máx}) e o tempo para atingir a exaustão, variáveis frequentemente utilizadas como preditores de rendimento (FONSECA *et al.*, 2010), configurando uma adaptação benéfica ao exercício. Em relação às variáveis nutricionais, o grupo EAI apresentou menor ingestão alimentar e calórica e eficiência alimentar total. Em outros trabalhos com modelos animais e com humanos, a AI promoveu redução da ingestão alimentar (WAN, 2003; TINSLEY *et al.*, 2017). Analisando o comportamento murinométrico, tanto a AI quanto o HIIT como fatores isolados foram associados a menor massa corporal, adicionalmente, o grupo EAI apresentou massa corporal final menor comparado ao EX, mostrando que este efeito foi potencializado com a combinação das duas intervenções. Em relação à adiposidade, houve influência significativa apenas do fator exercício. No entanto, os depósitos de gordura sofreram influência tanto do exercício quanto da AI. O fornecimento de energia pelos tecidos adiposos ao corpo durante o jejum, pode ser responsável pela diminuição da adiposidade (KIM *et al.*, 2017). Em estudo experimental realizado por Batacan *et al.* (2016), o HIIT provocou mudanças benéficas na massa corporal, gordura visceral e epididimal em ratos. Os achados do presente trabalho são bastante relevantes, uma vez que a perda de massa e a melhora da composição corporal através da atividade física e modificações na dieta podem ajudar a diminuir o risco de doenças relacionadas ao acúmulo de gordura (DONNELLY *et al.*, 2009).

Em relação à morfologia cardíaca microscópica, no presente trabalho, o protocolo de HIIT utilizado resultou em hipertrofia de cardiomiócitos e aumento da área seccional dos cardiomiócitos e da fração intersticial de colágeno no VE. Modelos de HIIT têm sido utilizados para investigar a remodelação cardíaca provocada pelo exercício, uma vez que este tipo de exercício parece induzir adaptações estruturais e funcionais no coração de maneira mais eficaz do que exercícios de intensidades mais baixas (HARAM *et al.*, 2009; WANG; WISLOFF; KEMI, 2010). Em pesquisas experimentais que utilizaram HIIT, foi observado aumento do comprimento, largura, volume e massa do ventrículo esquerdo (KEMI *et al.*, 2004; KEMI *et al.*, 2005). Embora o protocolo do presente trabalho compreenda menor tempo de fase ativa e maior tempo de recuperação, a intensidade foi semelhante

aos níveis utilizados nos trabalhos citados anteriormente (KEMI *et al.*, 2004; KEMI *et al.*, 2005) e também foi capaz de induzir hipertrofia do VE, o que reforça o importante papel da intensidade do exercício nas alterações da morfologia cardíaca.

Na literatura, há evidências que a AI reduziu fibrose, marcadores de inflamação e dano oxidativo no coração de animais saudáveis (CASTELLO *et al.*, 2010). No presente estudo, é possível sugerir que o menor tamanho das estruturas microscópicas induzido pela alimentação intermitente caracteriza resposta adaptativa através do mecanismo de conservação de energia. Nesse sentido, investigações apontam que o jejum é acompanhado por diminuição da biossíntese de colágeno (SOKOLOVIC *et al.*, 2013). Considerando que o aumento do estresse oxidativo em resposta ao exercício de alta intensidade seja um possível indutor da fibrose no VE, alguns autores sugerem que a AI reduz a produção de EROS, bem como a expressão de genes pró-fibróticos no coração (CASTELLO *et al.*, 2010) o que pode explicar a redução da fração intersticial de colágeno na associação do exercício com alimentação intermitente no presente trabalho.

Conclusões

O exercício intervalado de alta intensidade, isoladamente, promove hipertrofia de cardiomiócitos e fibrose intersticial no miocárdio. Alimentação intermitente atenua as alterações morfológicas cardíacas induzidas pelo exercício.

Referências bibliográficas

- AHMET, I.; WAN, R.; MATTSON, M. P.; LAKATTA, E. G.; TALAN, M. Cardioprotection by Intermittent Fasting in Rats. **Circulation**. v. 112, n. 20, p.3115-3121. 2005.
- ASTORINO, T. A.; ALLEN, R. P.; ROBERSON, D. W.; JURANCICH, M. Effect of high-intensity interval training on cardiovascular function, VO₂max, and muscular force. **Journal of Strength and Conditioning Research**. v.26, p. 138– 145, 2012.
- BATACAN, R. B. Jr; DUNCAN, M. J.; DALBO, V. J.; CONNOLLY, K. J.; FENNING, A. S. Light-intensity and high-intensity interval training improve cardiometabolic health in rats. **Applied physiology, nutrition, and metabolism**. v. 41, p. 945-952. Sep. 2016.
- CASTELLO, L.; FROIO, T.; MAINA, M.; CAVALLINI, G.; BIASI, F.; LEONARDUZZI, G.; DONATI, A.; BERGAMINI, E.; POLI, G.; CHIARPOTTO, E. Alternate-day fasting protects the rat heart against age-induced inflammation and fibrosis by inhibiting oxidative damage and NF-κB activation. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 48, p.47–54, 2010.
- Committee on Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the care and use of laboratory animals. Bethesda: National Institute of Health, 1985.
- DONNELLY, J.E.; BLAIR, S.N.; JAKICIC, J.M.; MANORE, M.M.; RANKIN, J.W.; SMITH, B. K. Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. **Medicine and science in sports and exercise**. v.41, n.2, p.459- 471, Feb. 2009.
- FONSECA, R. M.; BARROSO, R.; PIVETTI, B. M. F.; SEABRA, F.; DREZNER, R.; FRANCHINI, E. efeitos crônicos do treinamento de exercícios intermitentes de alta intensidade. **REMEFE**. n.9, v.1, p.99-112, Ago. 2010.
- GIBALA, M. J; JONES, A. M. Physiological and performance adaptations to high-intensity interval training. **Nestlé Nutrition Institute workshop series**. v. 76, p. 51-60, Jul, 2013.
- HARAM, P. M.; KEMI, O. J.; LEE, S. J.; BENDHEIM, M. O.; AL-SHARE, Q. Y.; WALDUM, H. L.; GILLIGAN, L. J.; KOCH, L. G.; BRITTON, S. L.; NAJJAR, S. M.; WISLOFF, U. Aerobic interval training vs. Continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. **Cardiovascular research**. v.81, n.4, p.723-732, Mar. 2009.
- KEMI, O. J.; HARAM, M.; WISLØFF, U.; ELLINGSEN, Ø. Aerobic fitness is associated with cardiomyocyte contractile capacity and endothelial function in exercise training and detraining. **Circulation**. v.109, n.23, p.897–904, Jun. 2004.
- KEMI, L. J.; HARAM, P. M.; LOENNECHEN, J. P.; OSNES, J. B.; SKOMEDAL, T.; WISLOFF, U.; ELLINGSEN, O. Moderate vs. High exercise intensity: Differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function, **Cardiovascular Research**. v.67, p. 161–172, Jan-Apr, 2005.
- KIM, S. A.; LEE, Y. M.; CHOI, J. Y.; JACOBS, D. R. Jr.; LEE, D. H.; Evolutionarily adapted hormesis-inducing stressors can be a practical solution to mitigate harmful effects of chronic exposure to low dose chemical mixtures. **Environmental pollution**. v.7, n.233, p. 725-734, Nov, 2017.
- MARTINEZ, P. F., OKOSHI, K., ZORNOFF, L. A., OLIVEIRA, S. A., CAMPOS, D. H., LIMA, A. R., DAMATTO, R. L.; CEZAR, M. D. M.; BONOMO, C.; GUIZONI, D. M.; PADOVANI, C. R.; CICOGNA, A. C.; OKOSHI, M. P. Echocardiographic detection of congestive heart failure in post infarction rats. **Journal of applied physiology**. v. 111, n. 2, p. 543-551, Aug. 2011.
- MATTSON, M. P.; LONGO, V. D.; HARVIE, M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. **Ageing Research Reviews**. v. 39, p. 46–58, 2017.
- MOREIRA, J. B., BECHARA, L. R., BOZI, L. H., JANNING, P. R., MONTEIRO, A. W., DOURADO, P. M., WISLØFF, U.; BRUM, P. C. High-versus moderate-intensity aerobic exercise training effects on skeletal muscle of infarcted rats. **Journal of applied physiology**. v. 114, n. 8, p. 1029-1041, Apr. 2013.
- OLIVEIRA JUNIOR, S. A.; MARTINEZ, P. F.; GUIZONI, D. M.; CAMPOS, D. H.; FERNANDES, T.; OLIVEIRA, E. M.; OKOSHI, M. P.; OKOSHI, K.; PADOVANI, C. R.; CICOGNA, A. C. AT1 receptor blockade attenuates insulin resistance and myocardial remodeling in rats with diet-induced obesity. **Plos One**. n.9, p.1-10, 2014.
- SOKOLOVIC, A.; VAN ROOMAN, C. P.; OTTENHOFF, R.; SCHEIJ, S.; HIRALALL, J. K.; CLAESSEN, N.; ATEN, J.; OUDE ELFERINK, R. P.; GROEN, A. K.; SOKOLOVIC, M. Fasting reduces liver fibrosis in a mouse model for chronic cholangiopathies. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1832, p. 1482- 1491, 2013.
- TINSLEY, G. T.; FORSS, J. S.; BUTLER, K. B.; PAOLI, A.; BANE, A. A.; BOUNTY, P. M. L.; MORGAN, G. B.; GRANDJEAN, P. W. Time-restricted feeding in Young men performing resistance training: A randomized controlled trial, **European Journal of Sport Science**, v.17, n.2, p.200-207, Mar. 2017.
- WAN, R.; CAMANDOLA, S.; MATTSON, M. P. Intermittent fasting and dietary supplementation with 2-deoxy-D-glucose improve functional and metabolic cardiovascular risk factors in rats. **FASEB Journal**. v.17, n.9, p. 1133–1134, Jun, 2003.
- WANG, Y.; WISLOFF, U.; KEMI, O. J. Animal models in the study of exercise-induced cardiac hypertrophy. **Physiological research**. v.59, n.5, p.633–644, Apr. 2010.