

Seleção de modelos de crescimento utilizando a proposta de Potthoff & Roy em animais induzidos à estenose aórtica submetidos a treinamento físico

Lívia Paschoalino de Campos¹, Gislaíne Cristina Batistela², Vitor Loureiro da Silva³, Carlos Roberto Padovani⁴

¹ Doutora em Biometria, Fatec-Botucatu, livia.campos@fatec.sp.gov.br

² Doutora em , UNESP – Câmpus Experimental de Itapeva, gislaíne.batistela@unesp.br

³ Doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica, UNESP – FC/Bauru, vitorloureiro_ed.fisica@hotmail.com

⁴ Professor Titular, UNESP – IBB/Botucatu, cr.padovani@unesp.br

RESUMO

Problemas cardíacos têm sido uma das principais causas de morte da atualidade em todo mundo. Estudos experimentais, envolvendo atividade física são realizados com ratos como forma de avaliar medidas que atenuem o quadro clínico estabelecido pela indução da Estenose Aórtica (EAo). No presente estudo utilizou-se animais com EAo induzida e submetidos ao protocolo de treinamento físico; dois grupos foram utilizados, um grupo com 21 animais não treinados (NT) e outro com 23 treinados (T). Foi avaliada a tensão desenvolvida (TD) no músculo papilar dos animais quando submetidos a manobras sequenciais de cálcio (0,5 mM a 3,5 mM, espaçadas de 0,5 mM). Utilizando o ajuste de curvas de respostas via proposta de Potthoff & Roy, verificou-se que as estimativas da TD nos animais submetidos ao treinamento físico são superiores em todos níveis de cálcio; atenuando a agressividade da insuficiência cardíaca (IC). A velocidade de variação é mais elevada no grupo treinado na dose basal (0,5 mM) e inverte-se a partir da dose 1 mM, equilibrando-se nas doses mais altas. Embora não se verifique significância de diferenças nas curvas respostas há indicativo clínico que o treinamento físico propicia efeitos benéficos à TD.

Palavras-chave: Curvas de resposta. Estenose aórtica induzida. Treinamento físico.

1 INTRODUÇÃO

A remodelação cardíaca, segundo Mendes et al. (2010), tem como definição as alterações ocorridas na expressão gênica, moleculares, celulares ou intersticiais, que clinicamente se caracterizam por modificações no tamanho, massa, volume e função do coração, em resposta a uma agressão ocorrida.

Geralmente em pesquisas de remodelação cardíaca quando são avaliadas as manobras de cálcio realizadas na mesma unidade experimental submetida a doses acumulativas e sequenciais, a estrutura correlacional entre as respostas das variáveis biológicas estudadas nas diferentes concentrações não levadas em consideração, ou seja, irrelevam a relação de dependência existente, e cada uma das variáveis são analisadas separadamente sem considerar a estrutura de correlação existente.

Diante deste contexto, técnicas estatísticas mais robustas são empregadas, para o refinamento das informações e conclusões acerca da manobra sequencial de cálcio nos grupos não treinado (NT) e treinado (T) para a função mecânica tensão desenvolvida (TD).

Neste estudo, foram utilizados dados de um experimento com dois grupos de animais medidos de forma longitudinal em sete diferentes concentrações de cálcio, obtendo como resposta a variável mecânica associadas ao processo de remodelação cardíaca dos animais TD.

Há indicativos na literatura que o emprego de modelos polinomiais de crescimento sejam os mais adequados para descrever o comportamento da variável TD. Sendo assim, alguns modelos que envolvem curvas de crescimento expressas em funções polinomiais serão avaliados a fim de se encontrar o modelo mais indicado para descrever a TD nas concentrações de cálcio e avaliar seu comportamento e sua evolução.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento experimental, descrito a seguir, foi submetido e aprovado pela “Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP”, São Paulo – Brasil sob o protocolo de aprovação nº1138-2015.

O delineamento experimental utilizou 44 ratos machos da linhagem Wistar com 21 dias de idade, pesando entre 70 e 90 gramas e mantidos em mesmas e controladas condições de temperatura ambiente, umidade, ciclos de iluminação e alimentícia a fim de evitar qualquer tipo de viés.

Todos os animais foram submetidos ao mesmo protocolo, primeiramente recebendo a cirurgia e, posteriormente o treinamento físico. A cirurgia é caracterizada pela colocação de um clipe de prata na raiz da aorta ascendente para induzir o animal à Estenose Aórtica (EAo). Após 18 semanas da realização da intervenção cirúrgica os animais foram divididos, de forma aleatória, em dois grupos, tendo um recebido o treinamento físico (T) que envolveu um programa de corrida em esteira rolante específica para ratos, grupo este composto por 23 animais e os que não receberam o treinamento físico (NT) com 21 animais.

Os animais do grupo T realizaram o treinamento físico cinco vezes por semana, durante 10 semanas consecutivas. Os animais foram submetidos a um período de adaptação à esteira rolante, o qual consistiu em caminhada de baixa intensidade com a

finalidade de diminuir o estresse ao ambiente. O tempo do treinamento aumentou progressivamente, apresentando as seguintes características: 10, 12, 14 e 16 minutos de duração nas semanas 1, 2, 3 e 4, respectivamente, e 16, 18 e 20 minutos de duração nas semanas 5, 6 e 7, respectivamente. O volume de treinamento foi então mantido em 20 minutos de duração até o final da décima semana de treinamento. O período experimental teve duração total de 28 semanas após a realização do procedimento cirúrgico (SILVA, 2019).

Após a realização do ecocardiograma, na 28ª semana, os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/ip; Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ip; Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e eutanasiados por meio de decapitação. Do coração de cada animal sacrificado, retira-se o músculo papilar a fim de que este seja avaliado pela técnica do músculo papilar isolado no ventrículo esquerdo quanto às funções mecânicas do miocárdio in vitro (CICOGNA et al., 2000). Tal técnica permite detectar se há alteração precoce na contração (sístole) e no relaxamento (diástole) do músculo cardíaco, dificilmente detectada na avaliação do coração in vivo.

Ao final da fase do protocolo experimental, submete-se o músculo papilar de cada animal a diferentes concentrações sequenciais de cálcio com o escopo de avaliar os mecanismos relacionados ao transporte de cálcio intracelular e à função miocárdica do ventrículo esquerdo. As concentrações de cálcio foram administradas sequencialmente, com aumento de 0; 5 mM a cada 5 minutos, iniciando-se na concentração 0; 5 mM até esta atingir 3; 5 mM, ou seja, 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 mM (SILVA, 2019).

Para a presente pesquisa, apenas a variável mecânica do miocárdio, tensão desenvolvida (TD) foi utilizada para avaliar o músculo papilar nas diferentes concentrações. Tal variável é caracterizada como a força necessária para distender um músculo em repouso em diferentes comprimentos.

Os dados obtidos estão estruturados como dados longitudinais, sendo assim possível, estudá-los por meio de curvas polinomiais utilizando o modelo linear multivariado de crescimento (MLMC), a fim de descrever os perfis médios das respostas de diferentes grupos e, assim, avaliar a influência de tempo, observar o comportamento, entre outras possíveis situações. Nesse sentido, destaca-se a proposta desenvolvida por Potthoff & Roy (1964) que consiste na generalização do modelo linear multivariado (MLM).

No presente estudo, houve interesse em testar alguns modelos polinomiais não convencionais via proposta de Potthoff e Roy (1964) que envolvessem as concentrações de cálcio transformadas, ou seja, alterações matemáticas funcionais na variável independente cálcio, a fim de se obter melhores respostas para a remodelação cardíaca frente a indicadores de Evangelista (2016).

Sendo assim, foram testados os seguintes modelos polinomiais: concentração de cálcio, raiz quadrada da concentração de cálcio, inverso da concentração de cálcio, inverso da raiz quadrada da concentração de cálcio, logaritmo natural da concentração de cálcio à unidade e inverso do logaritmo natural da concentração de cálcio à unidade.

Para a decisão acerca do grau do modelo polinomial mais adequado para descrever o comportamento da variável resposta TD, foram utilizados os seguintes passos para cada uma das classes (modelos) polinomiais não usuais avaliadas:

1. O processo inicia-se com o grau polinomial mais alto que pode ser ajustado como modelo preditivo. Nesse caso, é dado por $(p - 2)$, ou seja, 5º grau. Em que p são as concentrações sequenciais de cálcio.

2. Faz-se o teste de razão de verossimilhança para o grau do modelo que está sendo ajustado. Se o resultado for significativo, tem-se a necessidade desse grau polinomial para a predição do fenômeno e, caso contrário, passa-se para o grau $(p - 3)$, ou seja, 4º grau para a análise de significância.

3. Este procedimento é repetido toda vez que não se verificar a significância do resultado do teste.

4. Define-se como modelo de ajuste dos dados o modelo anterior àquele que tiver o resultado do ajuste do teste de grau polinomial mais baixo significativo e mais simples quanto à expressão matemática.

Após a definição do grau do polinômio ajustado, segundo Souza (1989), deve-se, então, obter as estimativas dos parâmetros a fim de construir o modelo preditivo mais adequado para a variável mecânica TD nos grupos estudados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As medidas descritivas (média e desvio padrão) são apresentadas segundo as concentrações de cálcio administradas nos dois diferentes grupos.

Tabela 1: Média e desvio padrão da TD segundo a concentração de cálcio (mM) e grupos

Grupo	Medida descritiva	Concentração de Cálcio (mM)						
		0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5
NT	Média	2,67	3,19	3,64	3,99	4,22	4,35	4,45
	Desvio Padrão	1,13	1,27	1,39	1,46	1,47	1,47	1,44
T	Média	2,90	3,40	3,87	4,21	4,58	5,19	5,28
	Desvio Padrão	1,47	1,67	1,84	1,89	1,86	1,81	1,83

É possível observar, na Tabela 1, que a média da variável mecânica TD para os grupos avaliados é crescente em valor, de acordo com o aumento das concentrações de cálcio; indicando um modelo contínuo de crescimento por unidade de cálcio, como resposta funcional da TD em relação às concentrações. O desvio padrão apresenta aumento em seu valor até a concentração 3,0 mM para o grupo NT, e no grupo T até a concentração 2,5 mM, depois dessas concentrações os desvios padrão diminuem.

A seguir, na Tabela 4.8, são apresentados os resultados estatísticos relativos aos graus dos polinômios para os seis modelos propostos.

2: Valor-p da estatística de teste para os graus do polinômio para a TD segundo o modelo polinomial proposto

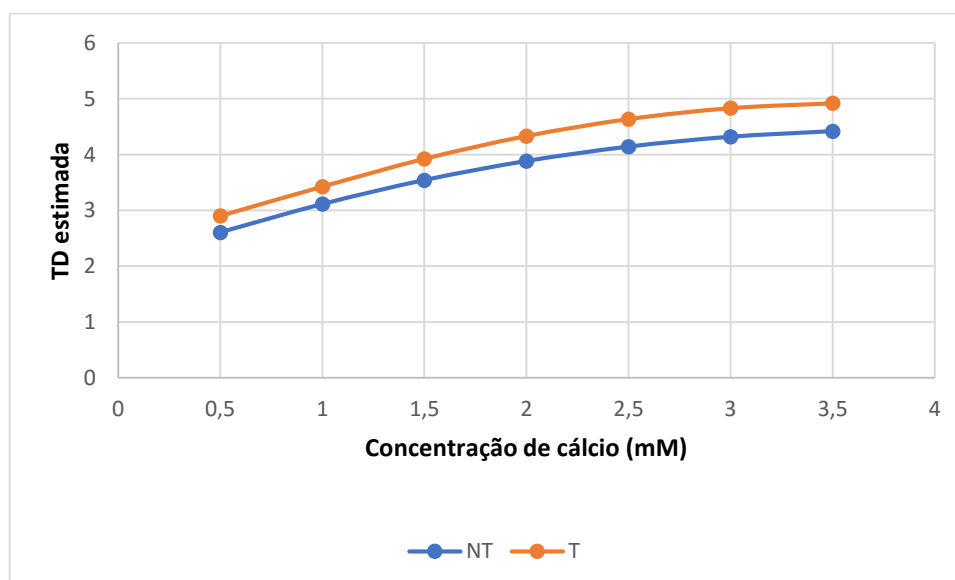
Polinômio	Grau do polinômio					
	5º	4º	3º	2º	1º	0º
$\sqrt{Ca}$	0,760	0,241	0,336	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
$\frac{1}{Ca}$	0,174	0,036	0,017	0,026	< 0,0001	< 0,0001
$\frac{1}{\sqrt{Ca}}$	0,582	0,197	0,018	0,001	< 0,0001	< 0,0001
$\ln(Ca + 1)$	0,720	0,244	0,454	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
$\frac{1}{\ln(Ca + 1)}$	0,539	0,140	0,011	0,025	< 0,0001	< 0,0001

A partir dos resultados da Tabela 2 é possível observar a significância dos polinômios avaliados do 5º ao 0º grau. Já no modelo que envolve a raiz quadrada da concentração de cálcio ($\sqrt{Ca}$) e para o polinômio associado ao logaritmo natural da

adição da concentração de cálcio à unidade 1 ($\ln(Ca + 1)$), a significância se dá a partir do 2º ao 0º. Para o inverso da concentração de cálcio ($\frac{1}{Ca}$) os valores-p foram significativos desde o 4º grau até o grau 0. O polinômio, definido como o inverso da raiz quadrada da concentração de cálcio ($\frac{1}{\sqrt{Ca}}$) e o polinômio associado ao inverso do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade 1 ($\frac{1}{\ln(Ca+1)}$) tiveram os ajustes dos modelos a partir do grau 3 sendo significativos. Diante deste contexto, os modelos de menor grau encontrados para descrever o comportamento da variável TD são o que apresenta raiz quadrada da concentração de cálcio ($\sqrt{Ca}$) e o polinômio associado ao logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade 1 ($\ln(Ca + 1)$), sendo ambos caracterizados por um polinômio de grau 3. Optou-se pelo modelo da raiz quadrada da concentração de cálcio ($\sqrt{Ca}$) por ser um modelo mais simples quando comparado modelo do logaritmo natural da adição da concentração de cálcio à unidade 1 ($\ln(Ca + 1)$).

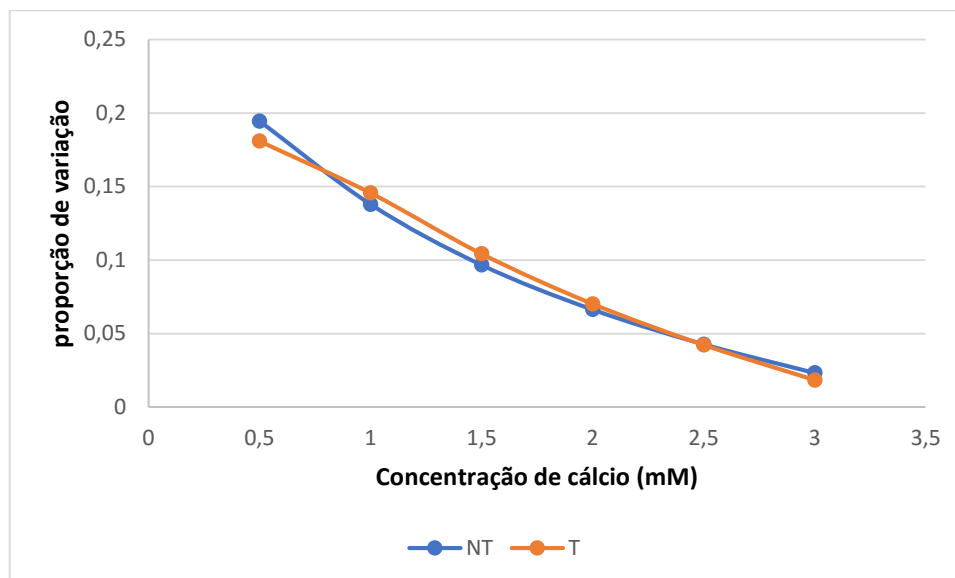
A partir das estimativas do modelo selecionado obteve-se a Figura 1.

Figura 1. Modelo estimado da resposta média da TD segundo grupo de treinamento físico nas diferentes concentrações de cálcio



Nota-se pela Figura 1 que os valores estimados pelo modelo polinomial em 3º grau na raiz da concentração de cálcio ($\sqrt{Ca}$), apresentou em todos os níveis considerados valores médios superiores para o grupo treinado.

Figura 2. Gráfico da proporção de variação da TD obtida a partir de concentrações consecutivas de cálcio segundo grupos de treinamento



As velocidades de crescimento da TD diminuí a medida que as concentrações de cálcio ficam mais elevadas e se equivalem a partir da dose 2,0 mM de cálcio.

No nível basal o treinamento torna-se mais suavizador para a elevação da resposta da TD, porém a partir da próxima dose essa situação se inverte.

4 CONCLUSÕES

Não foi possível identificar diferença significativa nos grupos T e NT, contudo as estimativas para o grupo T sempre revelaram maiores da TD em todos os níveis de cálcio evidenciando o efeito clínico benéfico do treinamento.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CICOGNA, A. C.; PADOVANI, C. R.; OKOSHI, K.; ARAGON, F. F.; OKOSHI, M. P. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. **The American Journal of the Medical Sciences**, v.320, n.4, p.244–248, 2000.

EVANGELISTA, M. C. **Construção de curvas polinomiais para a resposta funcional do músculo papilar isolado em diferentes concentrações de cálcio**. Botucatu, 2016. 79p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista.

MENDES, O. C.; CAMPOS, D. H. S.; DAMATTO, R. L.; SUGIZAKI, M. M.; PADOVANI, C. R.; OKOSHI, K.; CICOGNA, A. C. Remodelamento cardíaco: análise seriada e índices de detecção precoce de disfunção ventricular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.94, n.1, p.62–70, 2010.

POTTHOFF, R. F.; ROY, S. N. A generalized multivariate analysis of variance model useful especially for growth curve problems. **Biometria**, v.51, n.1, p.313-326, 1964.

R CORE TEAM. R: **A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2019.

SILVA, V. L. **Participação do trânsito de cálcio e suas proteínas reguladoras na melhoria da função cardíaca de ratos com estenose aórtica supraválvular e disfunção ventricular submetidos a treinamento físico**. Botucatu, 2019. 80p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

SOUZA, L. **Curvas de crescimento: Análise de Dados Longitudinais Incompletos com Resíduos Autocorrelacionados**. Esalq - Piracicaba, 1989. 84p. Thesis(Ph.D.) -Universidade de São Paulo.

AGRADECIMENTOS

Ao Grupo de Pesquisa em Cardiologia Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu pela disponibilização dos dados utilizados neste trabalho.