

VICTOR NEIVA LAVORATO

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO ASSOCIADO À TERAPIA COM
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS SOBRE PARÂMETROS
CARDIOVASCULARES E PROPRIEDADES MECÂNICAS DE CARDIOMIÓCITOS
EM RATOS COM INFARTO DO MIOCÁRDIO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Educação Física, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA

MINAS GERAIS – BRASIL

2014

VICTOR NEIVA LAVORATO

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO ASSOCIADO À TERAPIA COM
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS SOBRE PARÂMETROS
CARDIOVASCULARES E PROPRIEDADES MECÂNICAS DE CARDIOMIÓCITOS
EM RATOS COM INFARTO DO MIOCÁRDIO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em Educação
Física, para a obtenção do título de Magister
Scientiae

APROVADO: 28 de março de 2014



Daise Nunes Queiroz da Cunha
(Coorientadora)



Edilamar Menezes de Oliveira



Antônio José Natali
(Orientador)

*Aos meus pais Luiz Fernando e
Sônia, meus maiores exemplos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar e abençoar durante os sete anos que estive em Viçosa.

Aos meus pais, Luiz Fernando e Sônia Maria, e à minha irmã, Stefânia, por todo amor e carinho. Agradeço também ao apoio e condições que me proporcionaram desde que cheguei em Viçosa.

Ao Prof. Antonio Jose Natali, a quem conheci em 2007, e desde então fez com que eu me interessasse pela pesquisa. Agradeço pelo respeito e apoio durante esses anos trabalhando em conjunto.

À Profa. Edilamar Menezes de Oliveira pela oportunidade de realizar os experimentos no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Exercício da Escola de Educação Física e Esportes (EEFE) da Universidade de São Paulo (USP). Agradeço também, apesar do pouco tempo de contato, ao respeito e atenção que me foram concedidos.

À Dra. Daise Nunes Queiroz da Cunha, que esteve comigo durante todo o experimento, e foi fundamental no desenvolvimento e orientação do experimento.

Ao Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo, pela ajuda quando o microscópio confocal estava em manutenção e pela orientação quanto à redação e discussão dos efeitos das células-tronco mesenquimais (CTMs).

Ao Prof. Thales Nicolau Prímola Gomes, pela coorientação, principalmente na preparação dos experimentos.

À Dra. Vanessa Guedes Pereira, pelo apoio quanto à anestesia durante a cirurgia dos animais experimentais.

Ao Felipe e à Juliana, pelo compromisso, dedicação e seriedade durante todo experimento. Desculpem-me pelas discussões. Esse trabalho também é de vocês.

À Bárbara Silva Okano, pela ajuda com as CTMs e na cirurgia dos animais, e pela amizade de longa data.

À Profa. Betânia Souza Monteiro, pela colaboração no que diz respeito à caracterização das CTMs.

À Glória de Fátima Alves da Mota, pela ajuda nas análises proteicas e gênicas na EEFE-USP, além do apoio incondicional durante a estadia em São Paulo.

Aos colaboradores durante o experimento: Filipe, Mateus, Luis Henrique (Peixe), Thamires, Camila, Aurora, Helder. Sem a ajuda de vocês, não conseguiríamos chegar ao resultado final.

Aos amigos de sempre: Lucas, Miguel e Judson. Obrigado pelo convívio agradável desde 2007 no BioEx e pelos trabalhos desenvolvidos em conjunto.

Aos amigos de Piraúba, Astolfo Dutra e Viçosa, pelos momentos de descontração e apoio.

Ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Exercício da EEFE - USP, pela oportunidade de realizar as análises proteicas.

Ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa (UFV), por ceder o espaço no centro cirúrgico para realização das cirurgias e estudos hemodinâmicos.

À Universidade Federal de Viçosa e à Universidade de São Paulo, e a todos os seus funcionários que contribuíram direta ou indiretamente pela possibilidade de realização desse trabalho.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, que proporcionou a realização dos experimentos de microscopia confocal.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo fundamental auxílio financeiro.

Aos animais de experimentação e a todos que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O infarto do miocárdio e o remodelamento cardíaco: uma visão global e celular dos danos ocorridos no coração.....	1
1.2. Tratamentos não farmacológicos após o infarto do miocárdio.....	5
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. Objetivo Geral.....	11
2.2. Objetivos Específicos	11
3. METODOLOGIA.....	12
3.1. Animais experimentais e tratamentos	12
3.2. Programa de treinamento físico	13
3.3 Indução do Infarto do Miocárdio	13
3.3.1. Anestesia para toracotomia	13
3.3.2 .Toracotomia e Infarto do Miocárdio	14
3.3.3. Cuidados pós-operatórios	15
3.4. Coleta das CTMs da medula óssea	15
3.4.1. Caracterização celular	16
3.4.2. Nanomarcção das CTMs da medula óssea	17
3.4.3. Transplante de células	17
3.5. Identificação das CTMs derivadas da medula óssea	18
3.6. Análise ecocardiográfica.....	19
3.7. Avaliação histológica para medida do tamanho do infarto.....	20

3.8. Isolamento dos cardiomiócitos	21
3.9. Soluções de isolamento.....	22
3.9.1. Solução de perfusão Tampão HEPES	22
3.10. Contratilidade Celular	23
3.11. Medidas do transiente de $[Ca^{2+}]_i$	25
3.12. Expressão de proteínas cardíacas.....	28
3.13. Análise Estatística.....	30
4. RESULTADOS	31
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES	55
7. REFERÊNCIAS	56
8. ANEXOS.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AAD: Artéria anterior coronária descendente

APX: Parede apical

ATP: Trifosfato de adenosina

BAS: Parede basal anteroseptal basal

BP: Parede basal posterior

Ca²⁺: Íon cálcio

CaCl₂: Cloreto de cálcio

CCEN: Circunferência da cicatriz endocárdica

CCEP: Circunferência da cicatriz epicárdica

c.c.r.: Comprimento celular em repouso

CEPVE: Circunferência epicárdica do ventrículo esquerdo

CEUA: Comissão de ética para uso de animais

CENVE: circunferência endocárdica do ventrículo esquerdo

CO₂: Dióxido de carbono

COBEA: Colégio brasileiro de experimentação animal

CON IM: Controle Infartado

CON IM CT: Controle Infartado e tratado com células-tronco mesenquimais

CON SH: Controle Sham

COX-2: ciclooxigenase-2 miocardial

CTM: Células-tronco mesenquimais

DAPI: 4', 6-diamidino-2-fenilindole

DATASUS: Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Brasil

DDVE: Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: dimetil-sulfóxido

dP/dT_{max}: Valor máximo da derivada temporal de pressão arterial

dP/dT_{min}: Valor mínimo da derivada temporal de pressão arterial

DSVE: Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo

EDSIV: Espessura diastólica septo interventricular

EDTA: Ácido etilenodiamino tetracético

EGTA: Ácido etilenoglicol tetracético

ENDO: Endocárdio

EPI: Epicárdio

EPPVEd: Espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo

EPPVEs: Espessura sistólica da parede posterior do ventrículo esquerdo

F: Fluorescência máxima

F₀: Fluorescência mínima

FLB: Foslambam

FLB_{ser16}: Fosfolambam fosforilada no resíduo de serina 16

FLB_{total}: Fosfolambam total

Fluo 4-AM: Fluo 4- acetoximetil-ester

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GMPc: monofosfato cíclico de guanosina

HEPES: ácido etanosulfônico-hidroxietyl piperazina

HGF: Fator de crescimento de hepatócito

IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IL-1 β : Interleucina - 1 β

IL-6: Interleucina – 6

IL-10: Interleucina - 10

IM: Infarto do miocárdio

IMPVE: Índice de movimentação parietal do ventrículo esquerdo

KCl: Cloreto de potássio

MA: Segmento anterior médio do ventrículo esquerdo

MAS: Parede anteroseptal média

MEF2: Fator estimulador de miócitos-2

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MgSO₄: Sulfato de Magnésio

MI: Segmento inferior médio do ventrículo esquerdo

mitoK_{ATP}: Canal de potássio dependente de ATP mitocondrial

ML: Segmento lateral médio do ventrículo esquerdo

MP: Segmento posterior médio do ventrículo esquerdo

MS: Segmento septal médio do ventrículo esquerdo

MVE: Massa do ventrículo esquerdo

NaCl: Cloreto de sódio

NaHPO₄: Fosfato de sódio

NCX: Canal trocador de Na⁺ e Ca²⁺

O₂: Oxigênio

ON: Óxido Nítrico

PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida

PC final: Peso corporal final

PC inicial: Peso corporal inicial

PD-1: Célula de morte programada 1

Peso Coração/PC: Razão do peso do coração pelo peso corporal final

PGE 2: Prostaglandina E2

PV: Peso dos ventrículos

PVD: Peso do ventrículo direito

PVE: Peso do ventrículo esquerdo

PVE/PC: Razão do peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal final

RC: Remodelamento cardíaco

RS: Retículo sarcoplasmático

RyR2: Receptor de rianodina tipo 2

sarcoK_{ATP}: Canal de potássio dependente de ATP sarcolemal

SDS: dodecil sulfato de sódio

SERCA2a: Isoforma cardíaca da Ca²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático

TGF- β : Fator de transformação do crescimento - β

TNF- α : Fator de necrose tumoral - α

TR IM: Treinado infartado

TR IM CT: Treinado infartado tratado com células-tronco mesenquimais

TR SH: Treinado Sham

TSG 6: Proteína de gene 6 induzida por fator de necrose tumoral

TTF: Tempo total até a fadiga

VDF: Volume diastólico final

VE: Ventrículo esquerdo

VO₂: volume de oxigênio

VO_{2max}: volume máximo de oxigênio

VSF: Volume sistólico final

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Avaliação da frequência de CD 34, CD 45, CD 90 e CD 54 por citometria de fluxo em CTMs oriundas da medula óssea de ratos Wistar. A intensidade de fluorescência de cada marcador de superfície nas CTM indiferenciadas (gráficos brancos ou abertos) esta comparada com os isotipos controle (gráfico preto). O eixo X representa a escala de fluorescência, sendo positivo quando as células ultrapassam 10^1 , O eixo Y indica o número de células avaliadas durante o evento. A) Gráfico de pontos demonstrando a população celular selecionada para o estudo (R1), que representou 43% de homogeneidade. As amostras da cultura revelaram expressão negativa para 96,53% de CD34 (B) e 93,89% de CD45 (C) e expressão positiva para 99,0% de CD90 (D) e 95,8% de CD 54 (E)

17

Figura 2. Fotomicrografia das CTMs após nanomarcção com Q-tracker®, demonstrando a fluorescência citoplasmática vermelha emitida pelas células em suspensão. Identificação das células transplantadas, presentes no pulmão do grupo 18 horas pós-IM. Os núcleos (N) em azul foram contra-corados com DAPI. Os * indicam a região dos alvéolos pulmonares. Barra 50 μm

19

Figura 3. Representação do programa utilizado para aquisição das imagens e dos registros das contrações dos cardiomiócitos isolados. A definição das bordas direita e esquerda é projetada através dos picos verde e vermelho, respectivamente

24

Figura 4. Traçado representativo de uma contração celular estimulada na frequência de 1 Hz, e os parâmetros avaliados

25

Figura 5. Cardiomiócito isolado incubado com o indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo-4 AM). A linha de varredura (vermelha) foi posicionada no eixo longitudinal da célula, com o cuidado de não cruzar regiões de núcleo

27

Figura 6. A) Traçados representativos das imagens de fluorescência para o transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em cardiomiócitos isolados de ratos. B) Resultado da análise da imagem do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e os parâmetros avaliados

28

Figura 7: Fotomicrografias representativas da parte medial dos corações em corte transversal corados com *picro sirius red*. A região infartada apresenta-se corada em vermelho. CON SH, Controle Sham. CON IM, Controle Infartado. CON IM CT, Controle Infartado + CTMs. TR SH, Treinado Sham. TR IM, Treinado Infartado. TR IM CT, Treinado Infartado + CTMs 33

Figura 8. Tempo total de exercício até a fadiga dos animais experimentais após o período de treinamento de corrida aeróbio. CON SH, Controle Sham. CON IM, Controle Infartado. CON IM CT, Controle Infartado + CTMs. TR SH, Treinado Sham. TR IM, Treinado Infartado. TR IM CT, Treinado Infartado + CTMs. Dados são média ± EPM de 13 – 15 ratos por grupo. * significativamente diferentes dos seus controles 34

Figura 9. Contratilidade dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais experimentais. (A) Amplitude de contração (% de variação do comprimento celular de repouso). (B) Tempo para o pico de contração celular (ms). (C) Tempo para 50% do pico de relaxamento celular (ms). CON SH, Controle Sham. CON IM, Controle Infartado. COM IM CT, Controle Infartado + CTMs. TR SH, Treinado Sham. TR IM, Treinado Infartado. TR IM CT, Treinado Infartado + CTMs. Dados são média ± EPM de 50-70 células em cada grupo. *significativamente diferentes dos seus controles; † significativamente diferente dos grupos controle; # significativamente diferente dos grupos treinados 38

Figura 10. Transiente de $[Ca^{2+}]_i$ dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais experimentais. (A) Amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (F/F_0). (B) Tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (ms). (C) Tempo para 50% do decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$. CON SH, Controle Sham. CON IM, Controle Infartado. COM IM CT, Controle Infartado + CTMs. TR SH, Treinado Sham. TR IM, Treinado Infartado. TR IM CT, Treinado Infartado + CTMs. Dados são média ± EPM de 4 a 6 corações por grupo. * significativamente diferentes dos seus controles; † significativamente diferente dos grupos controle; # significativamente diferente dos grupos treinados; § significativamente diferente do grupo CON SH 40

Figura 11: Expressão proteica no ventrículo esquerdo dos animais experimentais. (A) Imagem representativa das bandas das proteínas analisadas. (B) Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA 2a). (C) Canal trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX). (D) Fosfolambam fosforilada na serina 16 (FLB_{ser16}). (E) Fosfolambam total (FLB_{total}). CON SH, Controle Sham. CON IM, Controle Infartado. COM IM CT, Controle Infartado + CTMs. TR SH,

Treinado Sham. TR IM, Treinado Infartado. TR IM CT, Treinado Infartado + CTMs. *
significativamente diferentes dos seus controles

42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso corporal, peso do coração, peso dos ventrículos e peso relativo dos ventrículos do ventrículo esquerdo e do coração	32
Tabela 2: Tamanho do infarto do miocárdio experimental	33
Tabela 3: Dados ecocardiográficos do ventrículo esquerdo	35

RESUMO

LAVORATO, Victor Neiva, M Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2014. **Efeitos do treinamento físico aeróbio associado à terapia com células-tronco mesenquimais sobre parâmetros cardiovasculares e propriedades mecânicas de cardiomiócitos em ratos com infarto do miocárdio experimental.** Orientador: Antonio Jose Natali. Coorientadores: Daise Nunes Queiroz da Cunha, Ricardo Junqueira Del Carlo, Thales Nicolau Prímola-Gomes.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do treinamento aeróbio de baixa intensidade associado à terapia de células-tronco mesenquimais (CTMs) nos parâmetros cardiovasculares e propriedades mecânicas de cardiomiócitos em ratos com infarto do miocárdio (IM) experimental. Ratos Wistar (idade: 30 dias; peso corporal: $118,01 \pm 11,24\text{g}$) foram divididos em seis grupos experimentais: CON SH e TR SH – Controle Sham e Treinado Sham; CON IM e TR IM – Controle Infartado e Treinado Infartado; CON IM CT e TR IM CT – Controle Infartado + CTMs e Treinado Infartado + CTMs. Os animais dos grupos IM foram submetidos à toracotomia e ligadura da artéria coronária anterior descendente. Os animais dos grupos Sham foram submetidos ao mesmo procedimento, mas sem a ligadura. Os animais dos grupos TR foram submetidos a um programa progressivo de corrida em esteira por 12 semanas, sendo a duração e a intensidade final de 60 minutos e 60-70% da velocidade máxima de corrida, respectivamente. CTMs da medula óssea do fêmur de ratos Wistar foram usadas para transplante celular alogênico através da veia caudal (concentração: 1×10^6 células). As análises hemodinâmicas foram realizadas por ecocardiografia, ao final do experimento. O tamanho do infarto foi determinado por histomorfometria. As propriedades mecânicas e o transiente intracelular global de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) de cardiomiócitos da área remanescente ao IM foram mensurados usando-se um sistema de detecção de bordas e microscopia confocal, respectivamente. A expressão das proteínas reguladoras do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foi determinada por *Western Blot*. Os resultados mostraram que o tamanho do infarto foi em média 30%. As CTMs foram localizadas apenas no pulmão dos animais. O treinamento aplicado aumentou o tempo total até a fadiga nos animais treinados, comparados aos controles sedentários. O infarto diminuiu a espessura do septo interventricular (ESSIV), as frações de ejeção e de encurtamento do ventrículo esquerdo (VE), com aumentos no diâmetro diastólico e sistólico (DSVE) do VE. Em nível celular, o IM aumentou a amplitude de contração e do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, e o tempo para 50% do decaimento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. A terapia com CTMs aumentou as frações de ejeção e de encurtamento do VE e reduziu a amplitude e o tempo para 50% do decaimento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. O treinamento aplicado diminuiu o

DSVE e aumentou as frações de ejeção e de encurtamento do VE, a espessura do VE e a ESSIV. Além disso, reduziu o tempo para o pico de contração e o tempo para 50% do relaxamento e aumentou a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, assim como a expressão da Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático e da fosfolambam fosforilada na serina 16 (FLB_{ser16}). A associação do treinamento físico à terapia com CTMs reduziu o tempo para o pico de contração e aumentou a amplitude de $[Ca^{2+}]_i$, bem como a expressão de FLB_{ser16}. Conclui-se que o treinamento físico aeróbio de baixa intensidade e a terapia com CTMs, isoladamente ou em associação, promovem adaptações benéficas em parâmetros cardiovasculares e propriedades mecânicas de cardiomiócitos em ratos com IM experimental.

ABSTRACT

LAVORATO, Victor Neiva, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2014. **Effects of aerobic exercise training associated with mesenchymal stem cell therapy on cardiovascular parameters and mechanical properties of cardiomyocytes in rats with experimental myocardial infarction.** Adviser: Antonio Jose Natali. Co-advisers: Daise Nunes Queiroz da Cunha, Ricardo Junqueira Del Carlo, Thales Nicolau Prímola-Gomes.

The aim of this study was to evaluate the effects of low-intensity aerobic exercise training associated with mesenchymal stem cell therapy (MSCs) on cardiovascular parameters and mechanical properties of cardiomyocytes in rats with experimental myocardial infarction (MI). Male Wistar rats (age: 30 days; body weight: 118 ± 11 g) were divided into six groups: control sham (CON SH), trained sham (TR SH), control infarction (CON MI), trained infarction (TR MI), control infarction plus stem cells (CON MI SC) and trained infarction plus stem cells (TR MI SC). Animals from MI groups were subjected to thorotomy ligation of the anterior descending coronary artery. Animals from Sham groups were submitted to the same procedure but ligation of the coronary branch. Animals from TR groups were submitted to a progressive treadmill running training for 12 weeks, being the final duration and intensity of 60 min and 60-70% of maximal running speed, respectively. MSCs from the Wistar rat femoral bone marrow were used to allogenic cell transplantation through the tail vein (concentration: 1×10^6 cells). Hemodynamic analyzes were performed by echocardiography at the end of the experimental period. The infarct size was determined by histomorphometry. The mechanical properties and the intracellular global calcium transient $[Ca^{2+}]_i$ were measured using an edge detection system and confocal microscopy, respectively. The expression of calcium regulatory proteins was measured by western blotting. The results showed that the average infarct size was of 30%. Exercise training increased the total time until fatigue in trained animals as compared to their controls. MI decreased the systolic interventricular septum thickness (ESSIV), and the fractions of ejection and shortening of the left ventricle (LV), with increases in the LV diastolic diameter and in the LV systolic diameter (DSVE). At the cellular level, MI increased the amplitude of cell contraction and of $[Ca^{2+}]_i$ transient and the time to 50% decay of $[Ca^{2+}]_i$ transient. The cellular therapy increased the fractions of ejection and shortening of the LV and reduced the amplitude and the time to 50% decay of the $[Ca^{2+}]_i$ transient. Exercise training reduced the DSVE and increased the fractions of ejection and shortening of the LV, the LV thickness and the ESSIV. At the cellular level, exercise training reduced the time to peak of contraction and the time to 50%

relaxation and increased the amplitude of the $[Ca^{2+}]_i$ transient. It also augmented the expression of the Ca^{2+} ATPase of the sarcoplasmic reticulum (SERCA 2a) and phospholamban phosphorylated at serine 16 (PLB_{ser16}). The combination of exercise training and cellular therapy decreased the time to peak of contraction and increased in the amplitude of the $[Ca^{2+}]_i$ transient, as well as the expression of PLB_{ser16}. In conclusion, low-intensity exercise training and therapy with MSCs, either isolated or in combination, promotes beneficial adaptations to the heart of rats with experimental MI.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O infarto do miocárdio e o remodelamento cardíaco: uma visão global e celular dos danos ocorridos no coração.

As doenças cardiovasculares são responsáveis pela maior parte da mortalidade no mundo. No ano de 2011, a Organização Mundial de Saúde verificou cerca de sete milhões de óbitos devido a doenças isquêmicas do coração. Dentre os acometimentos cardíacos gerados pelas doenças cardiovasculares, destaca-se o infarto do miocárdio (IM), antes considerado uma complicação que atingia em maior escala países desenvolvidos, hoje sendo comum também em países em desenvolvimento (WHITE; CHEW, 2008). No Brasil, o IM foi responsável por mais de 82 mil óbitos em 2011 (DATASUS).

O IM é caracterizado pela obstrução parcial ou total das artérias coronárias, responsáveis pela irrigação do miocárdio. Com a obstrução do fluxo sanguíneo coronariano parte do tecido sofre isquemia, e, caso essa persista, ocorrem danos irreversíveis que levam à morte de parte do miocárdio (MILL et al., 2011; VAN NIEUWENHOVEN; TURNER, 2013). Esses eventos geram um processo conhecido como remodelamento cardíaco (RC), que implica no rearranjo das estruturas cardíacas normalmente existentes (MILL et al., 1990; SWYNGHEDAUW, 1999).

O remodelamento cardíaco ocorre já que o coração tem capacidade de regeneração limitada, devido a relativa baixa taxa de mitose dos cardiomiócitos. Desse modo, as células que sobrevivem à isquemia sofrem hipertrofia, ao invés de proliferação. No caso do IM, essa hipertrofia é patológica e do tipo excêntrica (ERLEBACHER et al., 1984).

A morte celular é determinante para o RC, já que esse processo estabelece perda de tecido contrátil, hipertrofia compensatória dos cardiomiócitos e fibrose reparativa. Isso pode ocorrer de duas maneiras, por apoptose (morte celular geneticamente programada, sendo associada com marcadores pró e anti-apoptóticos como a Fas e a bcl-2, respectivamente) ou necrose (caracterizada por alterações na membrana, sendo precedida por um período de tempo durante o qual as células doentes tornam-se permeáveis às imunoglobulinas). Durante a isquemia, a principal forma de perda celular é por apoptose (SWYNGHEDAUW, 1999).

A matriz extracelular, em conjunto com os cardiomiócitos e as células endoteliais, musculares lisas, mastócitos e fibroblastos, constituem o miocárdio (MAGALHÃES et al., 2008). A matriz extracelular é composta principalmente por fibras de colágeno (tipo I e III) e é responsável por interligar os cardiomiócitos, formando as câmaras cardíacas. No IM, após a

morte dos cardiomiócitos, eventos celulares e moleculares são desencadeados a fim de reparar a área lesionada e manter a estrutura cardíaca (evitar o rompimento do ventrículo esquerdo), substituindo essa área por uma cicatriz de colágeno. Entretanto, com o decorrer do RC, as áreas não lesionadas pela isquemia também sofrem efeitos deletérios gerados pelo desequilíbrio entre a quantidade e a distribuição de colágeno (CLEUTJENS et al., 1995; DOBACZEWSKI; GONZALEZ-QUESADA; FRANGOIANNIS, 2010; VAN NIEUWENHOVEN; TURNER, 2013). O aumento da rigidez devido às alterações dos componentes da matriz extracelular (aumento de colágenos fibrilares) contribui para a perda da função cardíaca, diminuindo a complacência (CLEUTJENS et al., 1995).

Os danos estruturais instituídos pelo RC geram aumentos na secreção de neurohormônios endógenos e citocinas (ex. fator de necrose tumoral – α (TNF- α), interleucina – 6 (IL-6), interleucina - 1 β (IL-1 β)) (SWYNGHEDAUW, 1999; DOBACZEWSKI; GONZALEZ-QUESADA; FRANGOIANNIS, 2010). Em resposta a isso, ocorre aumento da atividade adrenérgica e do sistema renina-angiotensina, de forma a manter a perfusão (MILL et al., 1997; MCPHEE; GANONG, 2011). No entanto, os efeitos constantes dessa resposta causam a elevação da pré e da pós-carga, devido à vasoconstrição venosa e arterial (MCPHEE; GANONG, 2011). De forma simultânea, na área não infartada, a elevação do estresse diastólico final gera sobrecarga de volume que tende a normalizar o estresse parietal de acordo com a lei de Laplace (SWYNGHEDAUW, 1999).

Essas respostas à deterioração estrutural causam efeitos que produzem modificações na funcionalidade cardíaca, destacando-se a redução da pressão arterial média, da fração de ejeção, da dP/dt_{Max} (valor máximo da derivada temporal de pressão arterial) e dP/dt_{min} (valor mínimo da derivada temporal de pressão arterial), com aumento da pressão diastólica e diminuição da pressão sistólica do ventrículo esquerdo (HOLT et al., 1998; GUPTA; PRAHASH; ANAND, 2000; LOENNECHEN et al., 2002; WISLOFF et al., 2002).

A hipótese hemodinâmica tradicional é que as doenças que aumentam a carga hemodinâmica do coração, como o IM, causam insuficiência cardíaca através da indução dos efeitos deletérios na contratilidade dos cardiomiócitos (FRANCIS, 2001). Sabe-se que o RC leva ao aumento do comprimento dos cardiomiócitos e redução da espessura do ventrículo esquerdo (SWYNGHEDAUW, 1999). Isso ocorre devido à distribuição anormal de carga no ventrículo esquerdo, o que também explica as modificações contráteis dos cardiomiócitos próximos a área infartada (BOZI et al., 2013). Apesar disso, outros fatores como alterações na estrutura cardíaca, morte celular, utilização anormal de energia e distúrbios neurohormonais que ocorrem após a isquemia cardíaca, contribuem para a piora da função de bomba do

coração, independente dos danos na contratilidade dos cardiomiócitos (HOUSER; MARGULIES, 2003).

Estudos têm verificado que parte desses efeitos prejudiciais à contração do miocárdio deve-se a modificação da função de proteínas reguladoras do transiente de cálcio (Ca^{2+}) (WISLOFF et al., 2002; DE WAARD et al., 2007; MORK et al., 2007; SALLINEN et al., 2007; RESPRESS et al., 2012).

No que diz respeito às alterações nas proteínas que regulam o influxo de Ca^{2+} , Sallinen et al. (2007) observaram que após 1 dia, 2 semanas ou 4 semanas do IM em ratos Sprague-Dawley houve diminuição da expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) dos canais de Ca^{2+} tipo L. Por outro lado, Mork et al. (2007) mostraram que não houve alteração nos níveis proteicos dos canais de Ca^{2+} tipo L após 1 semana da indução do infarto em camundongos C57BL/6.

Em relação à liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS), para que haja a ativação da contração, observou-se que esta foi prejudicada pela redução nas taxas de RNAm do receptor de rianodina (RyR2) durante períodos diferentes de avaliação em ratos infartados (SALLINEN et al., 2007). Da mesma forma, Guo e colaboradores (2003) observaram diminuição no conteúdo proteico de RyR2 do ventrículo esquerdo de ratos Sprague-Dawley após 7 semanas de infarto.

O infarto acomete também as proteínas responsáveis pela retirada de Ca^{2+} do citosol, para que haja o relaxamento celular. Por exemplo, Wisloff et al. (2002) observaram que quatro semanas após o IM em ratas houve redução da expressão da cálcio ATP-ase do RS (SERCA 2a) nos cardiomiócitos destes animais. O mesmo ocorreu após sete semanas em outro estudo (GUO; CHAPMAN; DHALLA, 2003). Outro estudo comparou os efeitos de dois períodos pós-IM (12 e 28 semanas) sobre a recaptação de Ca^{2+} em ratas e foi verificado aumento nos níveis de SERCA 2a em ambos os períodos, sem alterações na FLB (DANIELS et al., 2007). Corroborando com esses achados, De Waard et al. (2007) observaram que após 8 semanas do IM, cardiomiócitos de camundongos apresentaram menores conteúdos proteicos de SERCA 2a, assim como diminuição na fosforilação da fosfolamban (FLB) no resíduo treonina 17 ($\text{FLB}_{\text{thr17}}$).

Quanto ao efluxo de Ca^{2+} através do sarcolema, os trocadores de sódio e cálcio (NCX) aparecem como principais responsáveis, porém, as modificações nessa proteína pós-IM ainda não são bem definidas. Por exemplo, Wisloff et al. (2002) mostraram que após quatro semanas de IM os cardiomiócitos de ratas apresentaram menores níveis de NCX, em relação aos controles. Da mesma forma, Yoshiyama et al. (1997) verificaram a expressão gênica de

NCX após uma e duas semanas e três meses do IM em ratos, tanto na região adjacente quanto na remanescente ao infarto. Eles mostraram que houve aumento dos valores de RNAm do NCX na área adjacente após a primeira e terceira semanas, mas diminuição ao fim do terceiro mês. Já a área remanescente ao IM, houve aumento destes valores em todos os períodos avaliados, o que também foi observado no estudo de Song et al. (2004). Concordando com esses resultados, cardiomiócitos da área remanescente de camundongos que foram submetidas ao IM aumentaram os níveis proteicos de NCX após uma semana do procedimento (MORK et al., 2007).

As alterações nas proteínas que controlam a homeostase do Ca^{2+} acarretam modificações no transiente intracelular global de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) e, por consequência, nas propriedades mecânicas de cardiomiócitos. Wisloff et al. (2002) encontraram maior tempo para 50% do decaimento de Ca^{2+} e para 50% do relaxamento celular em cardiomiócitos de ratas infartadas, quando comparados aos animais controle, mostrando os efeitos deletérios do IM sobre a diástole. Um estudo utilizando ovelhas verificou que cardiomiócitos da área adjacente ao infarto, após oito semanas do procedimento de ligadura da artéria coronária, apresentaram menor amplitude de contração celular e amplitude de transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, assim como maior tempo para 70% do relaxamento e para 70% do decaimento de Ca^{2+} . Os mesmos resultados não foram encontrados quando se analisou a região remanescente ao infarto (KIM et al., 2002). Por sua vez, Holt et al. (1998) observaram que cardiomiócitos da parede livre do ventrículo esquerdo aumentaram o tempo para o pico de transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, além de reduzir a amplitude de contração, a velocidade de contração e a velocidade de relaxamento, após seis semanas da indução do IM em ratos. O trabalho de Ait Mou et al. (2009) avaliou as respostas contráteis de cardiomiócitos da região próxima ao endocárdio (ENDO) e ao epicárdio (EPI) da parede livre do ventrículo esquerdo de ratos 18 semanas após o IM. Os autores encontraram redução da amplitude de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, da amplitude de contração e das velocidades de contração e relaxamento em cardiomiócitos ENDO dos ratos infartados. Os cardiomiócitos EPI desses animais não apresentaram diferenças significativas em relação aos seus controles.

Outro fator que altera a mecânica contrátil de cardiomiócitos é a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} , porém, ainda não há consenso entre os resultados dos estudos em animais infartados. Por exemplo, Fellenius et al. (1985) e Wisloff et al. (2002) observaram redução da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} em animais infartados, enquanto Ait Mou et al. (2009) não verificaram diferença entre animais infartados e controles.

Apesar dos resultados obtidos nos estudos ao longo dos anos, os mecanismos pelos quais essas alterações celulares ocorrem ainda não estão totalmente esclarecidos. Esses resultados controversos parecem estar relacionados com os períodos de avaliação pós-IM, assim como análises de regiões distintas do ventrículo esquerdo infartado (SIPIDO et al., 2002).

Verifica-se assim, o importante papel do remodelamento cardíaco pós-IM, que por um lado permite que o coração mantenha suas funções básicas em resposta ao aumento de carga hemodinâmica e, por outro, é um fator de risco para a disfunção ventricular e insuficiência cardíaca (MENDES et al., 2012).

1.2. Tratamentos não farmacológicos após o infarto do miocárdio.

Alternativas terapêuticas vêm sendo propostas para o tratamento do IM. Nesse contexto, o treinamento físico aparece como uma estratégia não farmacológica que pode atenuar as mudanças autonômicas cardíacas e a disfunção do ventrículo esquerdo (BARBOZA et al., 2012)

O exercício físico aeróbio realizado de forma regular causa adaptações fisiológicas importantes para o organismo, dentre elas destaca-se as cardiovasculares, as quais levam ao desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (MAGALHÃES et al., 2008). Durante o treinamento físico aeróbio, como corrida e natação, ocorrem alterações hemodinâmicas que acarretam em sobrecarga de volume, causando hipertrofia excêntrica, a qual gera tanto aumento da cavidade quanto da espessura da parede do ventrículo esquerdo (MAGALHÃES et al., 2008; HASHIMOTO et al., 2011). Além disso, o treinamento físico aeróbio gera outras alterações cardiovasculares, tais como aumento da capilarização, melhora da resposta mecânica da musculatura esquelética, aumento de atividades enzimáticas, melhor relação ventilação/perfusão, aumento da capacidade funcional pulmonar, aumento do débito cardíaco e da extração de oxigênio pelos tecidos (SCHEUER; TIPTON, 1977; GHORAYEB et al., 2005).

Após o IM, a tolerância ao exercício é reduzida, o que pode ser atenuada pelo treinamento físico aeróbio em função da elevação no pico do volume de oxigênio máximo VO₂max (SULLIVAN et al., 1989; PINA et al., 2003; BARBOZA et al., 2012).

O efeito cardioprotetor do treinamento físico aeróbio pode ser explicado por diversos mecanismos, dentre eles: o aumento da circulação coronariana (circulação colateral), o aumento de proteínas de choque térmico, o aumento da ciclooxigenase-2 miocárdial (COX-2),

melhora da função dos canais de potássio dependentes de ATP no sarcolema e na mitocôndria (sarcoK_{ATP} e mitoK_{ATP}, respectivamente) e ao aumento da capacidade antioxidante do miocárdio (HAMILTON et al., 2001; KONG et al., 2001; POWERS; QUINDRY; KAVAZIS, 2008; CHEN et al., 2010).

A cardioproteção oferecida pelo exercício físico aeróbio estabelece alterações estruturais e funcionais no miocárdio acometido pelo IM. Em animais, por exemplo, observaram-se aumento da fração de encurtamento e a diminuição do conteúdo de colágeno na matriz extracelular em resposta ao treinamento, gerando o aumento da complacência cardíaca (DE WAARD et al., 2007; XU et al., 2008b; XU et al., 2008a; CHEN et al., 2010). O treinamento físico aeróbio, como a corrida, mostra-se eficaz também na melhora da contratilidade do miocárdio pelo aumento da dP/dt_{max} e da dP/dt_{min} (KEMI et al., 2007; XU et al., 2008b), além da diminuição da pressão do ventrículo esquerdo no final da diástole e aumentar a pressão sistólica (KEMI et al., 2007).

Oenstein et al. (1995) utilizaram um programa de treinamento aeróbio em natação que teve início cinco semanas pós-IM e se estendeu por seis semanas. Eles verificaram aumento na espessura da parede e redução da cavidade do ventrículo esquerdo de ratos infartados, quando comparados aos controles. Esses resultados mostram que o treinamento físico aeróbio aplicado foi capaz de normalizar a tensão da parede no ventrículo esquerdo. Corroborando com esses achados, Ait Mou et al. (2009) mostraram que um treinamento aeróbio de corrida com duração de cinco semanas, realizado treze semanas após o IM, aumentou a relação peso do coração / peso corporal, que é utilizada como índice de hipertrofia cardíaca. Além disso, os autores observaram diminuição do diâmetro do ventrículo esquerdo durante a sístole.

Em nível celular, estudos têm mostrado que o treinamento físico é capaz de reverter, em parte, os danos causados pelo IM na contratilidade do miocárdio. Utilizando o treinamento intervalado com *sprints*, foram identificadas melhoras na contratilidade celular de ratos infartados, representadas pelo aumento da amplitude de contração, assim como redução no tempo para 50% do pico de contração e no tempo para 50% do relaxamento (ZHANG et al., 2000). O treinamento com corrida voluntária foi capaz de aumentar a amplitude de contração e diminuir a [Ca²⁺]_i durante a sístole e a diástole, sem ocasionar alterações na expressão da SERCA 2a e FLB em camundongos infartados (DE WAARD et al., 2007). Outro estudo, utilizando treinamento com corrida de baixa intensidade, verificou aumentos na amplitude de contração, na amplitude do transiente de [Ca²⁺]_i, na velocidade de contração e na velocidade de relaxamento em cardiomiócitos da região do sub-endocárdio de ratos infartados (AIT

MOU et al., (2009). Os autores observaram, ainda, aumentos na expressão de SERCA 2a, sem alteração nos níveis de FLB nos mesmos animais.

As adaptações mencionadas acima, em resposta a diferentes tipos de treinamento físico, demonstram que este pode restaurar parte dos danos contráteis causados pelo IM ao coração. Entretanto, os efeitos do treinamento físico aeróbio de baixa intensidade sobre o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e a expressão de proteínas reguladoras do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ de ratos infartados não estão completamente esclarecidos.

Outro tratamento utilizado para reparar os danos cardíacos ocasionados pela isquemia provocada pelo IM é a terapia com células-tronco. Essa população de células pode prevenir o afinamento da parede do ventrículo, a formação de cicatriz e o declínio da função sistólica (SHAKE et al., 2002).

Todas as células do corpo se originam de células-tronco, que são definidas como primitivas, indiferenciadas e pluripotentes, tendo a habilidade de se renovar através de divisão mitótica. Elas são obtidas tanto do embrião e do feto, quanto de várias regiões do corpo adulto (SHAH; SHALIA, 2011).

O miocárdio infartado induz a secreção de TNF- α , pela hipóxia, o qual estimula a expressão de vários fatores, como as quimiocinas, no coração infartado. As citocinas, fator 1 derivado de estroma, interleucina-8 e fator de crescimento endotelial vascular, promovem a mobilização de células-tronco e permitem a implantação delas no tecido isquêmico, onde se proliferam e diferenciam, expressando proteínas citoplasmáticas (ex. miosina cardíaca, α -actina sarcomérica e conexina 43) e proteínas nucleares (ex. Csx/Nkx 2.5, MEF 2, GATA-4) (ORLIC et al., 2001; DONG et al., 2010). Além disso, as células-tronco exercem efeitos parácrinos que ativam cardiomiócitos residentes e a proliferação de miócitos residuais, contribuindo para a cardiomiogênese, diminuição da apoptose de cardiomiócitos e remodelamento da cicatriz (SHAH; SHALIA, 2011).

As células-tronco que vêm sendo utilizadas atualmente para o reparo do miocárdio são os mioblastos esqueléticos, as células-tronco cardíacas, as células-tronco mesenquimais (CTMs), as células progenitoras endoteliais, as células-tronco sanguíneas do cordão umbilical, as células pluripotentes induzidas, as células hematopoiéticas e as células-tronco embrionárias. Todas essas possuem suas vantagens e desvantagens no tratamento do coração infartado (VILQUIN; MAROLLEAU; SCHWARTZ, 2005; JAMEEL; ZHANG, 2010; SHAH; SHALIA, 2011)

O melhor método de aplicação ou transplante das células-tronco a fim de reparar os efeitos deletérios do IM ainda tem sido discutido, porém, verifica-se que a terapia celular

intravenosa tem a capacidade de atingir não só a área afetada pela isquemia, como no método intracoronariano, mas também tecidos e vasos próximos à região infartada. A aplicação intravenosa pode ainda restaurar lesões causadas em eventos anteriores (SHAH; SHALIA, 2011).

Especificamente, as CTMs podem ser derivadas da medula óssea e do tecido adiposo. Esse tipo celular é pouco imunogênica devido à ausência de miosina de cadeia pesada II e expressão da molécula co-estimulatória B-7. Elas podem se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos e cardiomiócitos e induzem a angiogênese. O transplante das CTMs pode ser realizado de forma alogênica ou autóloga e elas são pluripotentes, além de poderem ser criopreservadas para o futuro. Dessa maneira, o tratamento utilizando as CTMs parece ser eficaz em corações acometidos pelo IM (VILQUIN; MAROLLEAU; SHWARTZ, 2005; JAMEEL; ZHANG, 2010; SHAH; SHALIA, 2011).

Para identificar os efeitos benéficos que as CTMs podem causar no coração isquêmico, estudos utilizando CTMs derivadas da medula óssea de humanos e de animais vêm sendo realizados. Nesse sentido, observam-se alterações estruturais cardíacas ocorridas em animais devido à terapia com essas células-tronco, tais como aumento da espessura e atenuação no aumento do diâmetro do ventrículo esquerdo (SHAKE et al., 2002; BERRY et al., 2006). Estes efeitos foram explicados, em parte, pela redução da fibrose e da apoptose, além da presença de miogênese e angiogênese (NAGAYA et al., 2004; BERRY et al., 2006; CARVALHO et al., 2006; LI et al., 2011). Essas adaptações na arquitetura do miocárdio geram modificações hemodinâmicas, tais como aumento da fração de ejeção e de encurtamento, o fluxo sanguíneo, reduzindo o volume sistólico e o diastólico final e aumento da pressão sistólica do ventrículo esquerdo (MIN et al., 2002; BERRY et al., 2006; LI et al., 2011; WANG, T. et al., 2012).

No que diz respeito à função contrátil do coração infartado que recebe o transplante das CTMs, foram verificados aumentos na dP/dt_{max} e da dP/dt_{min} (NAGAYA et al., 2004; KHOKHLOVA et al., 2012). Reforçando esses achados, Li et al. (2011) encontraram aumento do conteúdo proteico de SERCA 2a e RyR2 em cardiomiócitos de ratos infartados tratados com CTMs, mostrando uma possível melhora do acoplamento excitação-contração. O trabalho de Dos Santos et al. (2013) observou as alterações contráteis em nível de órgão e celular após terapia com células-tronco mononucleares da medula óssea em ratos que sofreram ligadura da coronária. Foram verificados aumento do volume de sistólico, do trabalho cardíaco e da dP/dt_{max} no ventrículo esquerdo, após 6 semanas do IM. Verificou-se ainda, o aumento da resposta inotrópica devido aos aumentos da concentração de Ca^{2+} e

melhora da contratilidade celular, com aumentos na expressão das proteínas SERCA 2a e FLB, fosforilação de FLB_{ser16} e redução da expressão dos NCX. Apesar disso, outros estudos ainda necessitam ser realizados para a compreensão da função da terapia de células-tronco sobre as propriedades mecânicas de cardiomiócitos.

A terapia com células-tronco mostrou-se capaz de aumentar a capacidade de exercício físico em indivíduos que sofreram IM. Estudos mostraram que indivíduos que receberam células-tronco derivadas da medula óssea de forma autóloga e por injeção intracoronariana, aumentaram o tempo de exercício físico (LUNDE et al., 2007), o pico de frequência cardíaca e o pico do VO₂ (LUNDE et al., 2007; STRABURZYNSKA-MIGAJ et al., 2012) 6 e 12 meses pós-IM, quando comparados ao grupo de infartados não tratados. Além disso, os indivíduos avaliados melhoraram a qualidade de vida, avaliada por um questionário contendo um componente físico e um mental (LUNDE et al., 2007).

Nota-se, portanto, que o tratamento com treinamento físico ou com terapia de células-tronco é eficaz na redução dos danos causados pelo IM. Entretanto, os efeitos desses tratamentos de forma associada sobre o coração, ainda não estão esclarecidos. Por exemplo, Waring et al. (2012) verificaram que o treinamento físico aeróbico, de baixa ou de alta intensidade, em ratos não infartados, aumentou a expressão de fatores de crescimento levando à hipertrofia cardíaca e à ativação e diferenciação de células-tronco progenitoras cardíacas. Apenas o estudo de Cosmo et al. (2012) avaliou os efeitos dos dois tratamentos associados pós-IM. Os autores injetaram células-tronco mononucleares da medula óssea em ratos infartados e iniciaram um programa de natação de baixa intensidade 30 dias após a isquemia, sendo que esse treinamento se estendeu por 30 dias. Os autores observaram aumento da fração de ejeção e redução da quantidade de fibras colágenas na região de fibrose no miocárdio do grupo treinado e tratado com células-tronco, em relação aos animais somente treinados.

Apesar dos efeitos benéficos do exercício físico regular e do transplante de células-tronco sobre a estrutura e função do coração infartado, não é de nosso conhecimento estudos que investigaram o efeito sinérgico desses tratamentos sobre parâmetros cardiovasculares e propriedades mecânicas de cardiomiócitos isolados. Dessa forma, a hipótese foi de que a associação dos dois tratamentos poderia potencializar os efeitos destes sobre o coração isquêmico, uma vez que as células-tronco contribuem para a regeneração do miocárdio, já que os cardiomiócitos tem uma taxa de mitose relativamente baixa (SHAH; SHALIA, 2011), e o treinamento físico é capaz de ativar mecanismos celulares que levam à hipertrofia cardíaca fisiológica e melhora funcional do miocárdio (ORENSTEIN et al., 1995; XU et al., 2008b; XU et al., 2008a; AIT MOU et al., 2009).

Além disso, a aplicação das CTMs logo após o IM e o treinamento iniciando 24hs após o IM, poderiam exercer seus efeitos benéficos ainda na fase de inflamação do remodelamento cardíaco, diminuindo a formação de fibrose (VAN NIEUWENHOVEN; TURNER, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar os efeitos do treinamento físico aeróbio iniciado 24hs após o IM associado à terapia com células-tronco mesenquimais sobre parâmetros cardiovasculares e propriedades mecânicas de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratos com infarto do miocárdio experimental.

2.2. Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos de um treinamento físico aeróbio com corrida em esteira de baixa intensidade associado à terapia celular com células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea sobre os seguintes parâmetros cardíacos e celulares de ratos submetidos ao IM experimental:

- Diâmetro sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo, fração de ejeção, fração de encurtamento, espessura sistólica e diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo, além da espessura sistólica e diastólica septo interventricular.
- Amplitude e duração de contração e relaxamento de cardiomiócitos isolados da zona remanescente ao infarto;
- Amplitude e duração das fases sistólica e diastólica do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ de cardiomiócitos isolados da zona remanescente ao infarto;
- Expressão das proteínas reguladoras do cálcio (NCX, SERCA 2a, FLB_{total} , FLB_{ser16}) no tecido cardíaco da zona remanescente ao infarto, no ventrículo esquerdo.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais experimentais e tratamentos

Foram utilizados 96 ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar, com 4 semanas de idade e peso corporal inicial de $118,01 \pm 11,24$ g (média \pm desvio padrão). Os animais foram obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (parecer nº 05/2013).

Os animais foram alojados em gaiolas coletivas (4-5 animais por gaiola), receberam água e ração comercial *ad libitum*, sendo mantidos em uma sala com temperatura média de 22°C e regime de luminosidade de 12/12hs claro/escuro. Os animais foram pesados no início e no final do experimento utilizando uma balança eletrônica digital (Rochelle, Brasil).

Os animais foram separados aleatoriamente em 6 grupos, com 16 animais em cada grupo, sendo:

- CON SH (controle e sham): ratos que não foram submetidos ao treinamento físico com corrida em esteira e sofreram cirurgia simulada de infarto do miocárdio;
- TR SH (treinado e sham): ratos que foram submetidos ao treinamento físico com corrida em esteira e sofreram cirurgia simulada de infarto do miocárdio;
- CON IM (controle e infartado): ratos que não foram submetidos ao treinamento físico com corrida em esteira e sofreram cirurgia do infarto do miocárdio;
- TR IM (treinado infartado): ratos que foram submetidos ao treinamento físico com corrida em esteira e sofreram cirurgia do infarto do miocárdio;
- CON IM CT (controle infartado + terapia de células-tronco): ratos que não foram submetidos ao treinamento físico com corrida em esteira, que sofreram cirurgia do infarto do miocárdio e terapia com células-tronco;
- TR IM CT (treinado infartado + terapia de células-tronco): ratos que foram submetidos ao treinamento físico com corrida em esteira, que sofreram cirurgia do infarto do miocárdio e terapia com células-tronco.

3.2. Programa de treinamento físico

O programa de treinamento físico com corrida foi realizado em uma esteira rolante (Insight Instrumentos – Ribeirão Preto, SP, Brasil), 5 dias por semana (de segunda a sexta-feira), 60 minutos por dia, durante 12 semanas, no Laboratório de Biologia do Exercício do Departamento de Educação Física da Universidade Federal de Viçosa.

Antes do início do treinamento físico, todos os animais foram colocados na esteira rolante para adaptação, durante 5 dias, 5 min/dia à velocidade de 5 m/min. Após 48 horas, realizou-se o infarto do miocárdio e o transplante das CTMs (item 3.3 e 3.4, respectivamente). O treinamento teve início então, 24 horas após esses dois procedimentos. Durante a primeira semana de treinamento físico, os animais correram a uma velocidade considerada leve (7-10 m/min) e com o tempo progredindo até alcançar 50 min de duração a cada sessão de treino. Após 48 horas, foi realizado o teste na esteira rolante para determinação da velocidade máxima de corrida, começando a 5 m/min, com incrementos de 3 m/min a cada 3 min até a fadiga de cada animal de todos os grupos experimentais. O momento da fadiga foi definido e o teste interrompido quando os animais não mantiveram a corrida de acordo com a velocidade da esteira. A intensidade do protocolo de treinamento foi monitorada através do aumento progressivo do tempo e da velocidade de corrida, atingindo 1 hora/dia a ~ 60% da velocidade máxima de corrida dos grupos TR SH, TR IM e TR IM CT, a partir da 2ª semana de treinamento até o final da 12ª semana. Ao final da 4ª e da 8ª semanas, realizou-se novamente o teste de esforço físico para ajuste da velocidade de corrida de cada grupo exercitado. Ao final da 12ª semana, realizou-se o teste de esforço físico para avaliar o desempenho final dos seis grupos experimentais.

3.3 Indução do Infarto do Miocárdio

3.3.1. Anestesia para toracotomia

Os animais foram colocados dentro de uma câmara de indução, onde foram anestesiados com isoflurano 3% e oxigênio 100% a um fluxo constante de 1mL/minuto. Uma vez inconscientes, os animais foram retirados da câmara de indução e colocados em decúbito dorsal em uma plataforma para imediata intubação. Uma frequência respiratória de 20 ciclos/minuto serviu de parâmetro para indicar o momento ideal para intubação. Para intubação orotraqueal foi usado o sistema para pequenos animais (BioLite, BioTex, Houston,

TX). Um catéter intravenoso medindo entre 16 e 20 gauges e 2,54cm de comprimento foi utilizado como sonda endotraqueal, dependendo do peso do animal. Imediatamente, o tubo endotraqueal foi conectado ao ventilador para pequenos animais (Inspira Advanced Safety Single Animal Pressure/Volume Controlled Ventilators, Harvard Apparatus, Massachusetts) e a frequência respiratória estabelecida entre 50 e 60 ciclos/minuto, com pressão entre 16 e 18 cm H₂O e fluxo de oxigênio de 550mL/minuto. Anestesia foi mantida com isoflurano até efeito. Para certificação do efeito da anestesia verificou-se a ausência de reflexo neuromuscular pelo pinçamento do dígito de um dos membros posteriores.

3.3.2 .Toracotomia e Infarto do Miocárdio

Com os quatro membros imobilizados e em decúbito dorsal sobre a plataforma, realizou-se ampla tricotomia da região torácica seguida de assepsia e anti-sepsia. O acesso à cavidade torácica deu-se mediante esternotomia mediana de aproximadamente 2 cm de extensão, mantendo-se intactos o manúbrio e o xifoide. Em seguida, afastou-se gentilmente os pulmões com o auxílio de um cotonete umedecido para facilitar a visualização, e o pericárdio foi então seccionado expondo o coração. A identificação do local para realização da ligadura da artéria coronária foi feita tendo como referência o apêndice atrial esquerdo. Procedeu-se então a ligadura da artéria coronária anterior descendente (AAD). A ligadura foi criteriosamente feita a uma distância de aproximadamente 2 mm do apêndice atrial esquerdo com ponto único, usando-se fio monofilamentar 5-0 ou 6-0. O ponto deveria ser profundo o suficiente para que a artéria fosse realmente bloqueada. Prontamente, a ligadura bem sucedida causava empalidecimento da região inferior ao ponto bloqueado. Alternativamente, o eletrocardiograma (PowerLab device -ref. ML865, ADInstruments, São Paulo) foi realizado para confirmar graficamente as alterações morfológicas do segmento S-T, durante o transoperatório.

A cavidade torácica foi fechada por duas camadas de suturas náilon 4-0: muscular e pele. Antes de completar a última sutura do tórax, a pressão positiva ao final da expiração foi exercida e mantida por aproximadamente 2 segundos com a finalidade de inflar os pulmões ao máximo.

A simulação da cirurgia realizada nos grupos SHAM consistiu do mesmo procedimento cirúrgico, porém sem oclusão da AAD.

3.3.3. Cuidados pós-operatórios

Os animais foram monitorados quanto à temperatura corporal (35,9 a 38°C medida por via retal) e aos movimentos respiratórios (85 ciclos/minuto) até ganharem consciência, quando foram colocados novamente na caixa com maravalha juntamente com outros animais operados.

A analgesia foi providenciada através da aplicação de Tramadol (Dorless V, Fort Dodge, Campinas) na dose de 4mg/kg a cada seis horas, por via intraperitoneal durante 24 hs. A antibioticoterapia com Enrofloxacin (Baytril 10%, Bayer S.A, São Paulo) foi administrada via intramuscular no período pré-operatório imediato na dose de 10mg/kg.

3.4. Coleta das CTMs da medula óssea

Ratos da linhagem Wistar (n = 5) foram submetidos à eutanásia por sobredosagem anestésica (câmara anestésica contendo isoflurano). Foi realizada tricotomia do abdômen e membros e imersão dos animais em álcool 70%, em seguida foram transferidos para capela de fluxo vertical laminar.

Realizou-se desarticulação e remoção dos fêmures de forma asséptica, secção das epífises distais, sendo o canal medular lavado com meio de crescimento Dulbecco's Modified Eagle's Medium baixa glicose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/EUA) acrescido de 20% de soro fetal bovino (Gibco), 50 mg/L de gentamicina (Sigma), 100000 U/L de penicilina G potássica (Sigma) e 1,5 mg/L de anfotericina B (Sigma); com auxílio de uma seringa de 10 mL e agulha de 25 G.

O material obtido foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. O precipitado contendo a fração celular foi ressuscitado em meio DMEM completo e plaqueado na concentração de 5×10^6 células/mL em frascos de cultura celular de 75 mm² (Sarstedt, Numbrecht, Alemanha), mantidos em estufa à 37°C com 5% de CO₂.

As culturas foram monitoradas diariamente com auxílio de microscópio invertido, e o meio de cultura foi trocado a cada três ou quatro dias, de acordo com a necessidade. Quando as células atingiram em torno de 80-90% de confluência, realizou-se o desprendimento do frasco de cultura por digestão enzimática com solução de 0,25% tripsina/EDTA (Sigma) e novo plaqueamento, permitindo a purificação, o cultivo e a expansão da população.

As células foram mantidas em cultura com repiques sucessivos no máximo até a quinta passagem, a fim de evitar a senescência proliferativa, quando, então, as células foram utilizadas (ZUK et al., 2002).

3.4.1. Caracterização celular

As células da quarta passagem foram caracterizadas por citometria de fluxo através da análise de expressão de moléculas de superfície celular: CD 73, CD 54, CD 90 e CD 45 (ZUK et al., 2002).

As células, na concentração de 1×10^6 , foram incubadas individualmente com os anticorpos primários (anti-CD45 clone 69 mouse – BD Bioscience, San Jose, Califórnia, EUA; anti-CD90 clone Ox-7 mouse – AbCam, Cambridge, Massachusetts, EUA; anti-CD73 clone 5 F/B9 mouse – AbCam; e anti-CD54 clone 1A29 mouse – AbCam), por 30 minutos à 4°C, lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com fluorocromo Alexa 488.

As amostras foram analisadas usando citômetro de fluxo FACScan e software CellQuest®, obtendo-se 30000 eventos por amostra testada.

Os resultados da caracterização celular realizada por meio de citometria de fluxo estão apresentados na Figura 1.

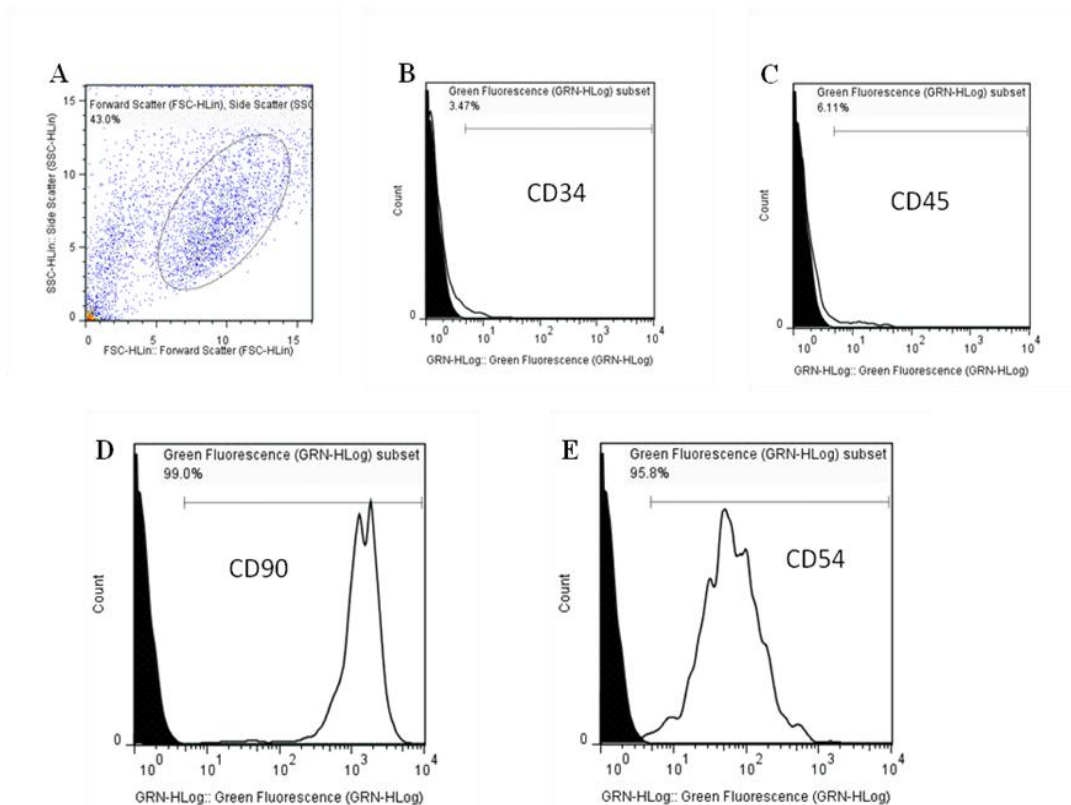


Figura 1: Avaliação da frequência de CD 34, CD 45, CD 90 e CD 54 por citometria de fluxo em CTMs oriundas da medula óssea de ratos Wistar. A intensidade de fluorescência de cada marcador de superfície nas CTM indiferenciadas (gráficos brancos ou abertos) esta comparada com os isotipos controle (gráfico preto). O eixo X representa a escala de fluorescência, sendo positivo quando as células ultrapassam 10^1 , O eixo Y indica o número de células avaliadas durante o evento. A) Gráfico de pontos demonstrando a população celular selecionada para o estudo (R1), que representou 43% de homogeneidade. As amostras da cultura revelaram expressão negativa para 96,53% de CD34 (B) e 93,89% de CD45 (C) e expressão positiva para 99,0% de CD90 (D) e 95,8% de CD 54 (E).

Dessa forma, a citometria de fluxo demonstrou que as células utilizadas no estudo, realmente eram células-tronco.

3.4.2. Nanomarcção das CTMs da medula óssea

Células de quarta passagem foram incubadas com o *Cell Labeling Kit Qtracker 655*® (Invitrogen) segundo recomendações do fabricante. A marcação foi confirmada através do microscópio de fluorescência antes da aplicação das células.

3.4.3. Transplante de células

As células nanomarcadas foram tripsinizadas e centrifugadas para a obtenção do *pellet* celular. O *pellet* foi ressuspenso em PBS e alíquotas de 1×10^6 células foram preparadas em 1,0 mL de PBS, centrifugadas e armazenadas em caixa de isolamento térmico até o momento da aplicação endovenosa.

3.5. Identificação das CTMs derivadas da medula óssea

CTMs derivadas da medula óssea foram isoladas do fêmur de ratos Wistar com 4 semanas de idade, cultivadas no meio base DMEM em placas de crescimento de cultura, mantidas em estufa incubadora à 37°C. Células da quarta passagem foram incubadas e marcadas com Q-tracker durante 45 minutos. Alíquotas celulares de 1 ml contendo 1×10^6 células, foram injetadas via veia caudal imediatamente após o IM. Um grupo de animais sofreu eutanásia 18h após o infarto e fragmentos dos tecidos do coração, baço e pulmão foram coletados com o objetivo de rastrear o destino das CTM transplantadas. As amostras foram fixadas em formalina de Carson por 24 horas. Transcorrido esse período, o material foi desidratado, diafanizado e incluído em parafina. Foram feitas secções transversais, de 5 μ m de espessura, com intervalo de 50 μ m entre elas. Foram acondicionados 6 cortes em cada lâmina histológica, 8 lâminas por animal. As lâminas foram montadas com meio de montagem contendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen, CA, EUA).

A imunofluorescência do Q-tracker 655® foi avaliada utilizando o filtro de excitação WG e para evidenciação do núcleo foi utilizado o filtro WU em microscópio de fluorescência (Olympus BX-60®, Tokyo, Japan). Foram capturadas cinco imagens por secção.

A Figura 2 mostra a nanomarcagem com Q-tracker ® das CTMs presentes no pulmão dos animais experimentais.

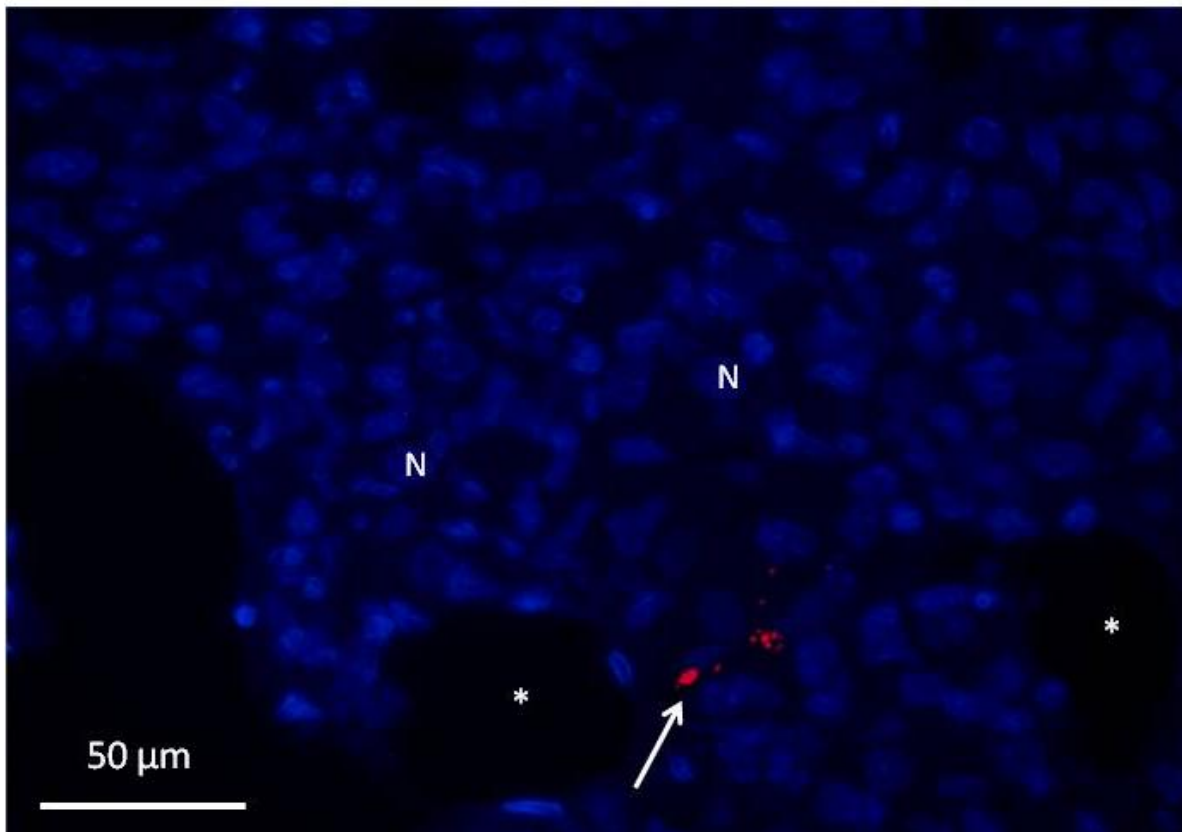


Figura 8. Fotomicrografia das CTMs após nanomarcção com Q-tracker®, demonstrando a fluorescência citoplasmática vermelha emitida pelas células em suspensão. Identificação das células transplantadas, presentes no pulmão do grupo 18 horas pós-IM. Os núcleos (N) em azul foram contra-corados com DAPI. Os * indicam a região dos alvéolos pulmonares. Barra 50 μm.

3.6. Análise ecocardiográfica

Para a realização do ecocardiograma, os animais foram imobilizados através de anestesia com isoflurano. O agente anestésico foi administrado através de um vaporizador e a indução feita pela administração de isoflurano 3% e oxigênio 100% em fluxo constante de um litro por minuto, por um período aproximado de 3 minutos. Para a manutenção da anestesia o isoflurano foi mantido a 1,5% através de cone nasal pequeno (adaptado para ratos) durante um período de 10 a 12 minutos para a realização da ecocardiografia. A temperatura corporal foi monitorada e controlada durante o exame através de bolsas com água aquecida a 37°C.

O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado por um veterinário cardiologista. O exame incluiu estudos bidimensionais (2D) com taxa de amostragem rápida (*frame rate*) de 120 fps e modo-M, usando o sistema de ultrassom (MyLab™30 – Esaote, Genoa, Itália) com transdutor (*phased array*) de 11,0 MHz de frequência nominal. As imagens foram obtidas

enquanto os animais permaneciam em decúbito dorsal, sob efeito de anestesia. Os ecocardiogramas transtorácicos bidimensionais (2D) e modo-M foram obtidos com (*sweep speed*) de 200 mm/s e ajustada de acordo com a frequência cardíaca. As imagens foram coletadas de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia e armazenadas para análise posterior. Cada parâmetro foi mensurado em três ciclos cardíacos distintos e a média das medidas foi utilizada para as análises estatísticas.

A espessura das paredes posterior e anterior (final da diástole e final da sístole) e as dimensões do ventrículo esquerdo foram mensuradas usando um método modificado preconizado pela Sociedade Americana de Ecocardiografia durante três ciclos cardíacos consecutivos (SAHN et al., 1978). Os registros em modo-M foram analisados usando um sistema de análise off-line disponível no mercado (no próprio aparelho) por um observador cego (DNQC) a resultados anteriores.

3.7. Avaliação histológica para medida do tamanho do infarto

Alguns animais de cada grupo sofreram eutanásia e os corações foram perfundidos com solução de KCl 14mM, removidos e processados para avaliação histológica (medida do tamanho do infarto). Os átrios foram separados e os ventrículos foram cortados transversalmente em 3 secções e o anel mediano (aproximadamente 3 mm) foi fixado em formalina de Carson 10% (por 48 horas), desidratados em bateria crescente de álcoois, incluídos em parafina e submetidos ao tratamento histológico convencional. Cortes de 5 µm de espessura foram seccionados, com intervalo de 50 µm, utilizando um micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045 Multicut, Alemanha). Foram montadas duas lâminas histológicas por animal, contendo 6 cortes em cada.

As lâminas foram coradas por *picro sirius red* e utilizadas para análise do tamanho do infarto. Utilizou-se um scanner (HP deskjet F380, EUA) para obtenção das imagens com aumento de 600dpi. As circunferências do endocárdio e epicárdio do tecido infartado e do ventrículo esquerdo foram determinadas com o auxílio de um software de análise de imagens (Image-Pro Plus 4.5; Media Cybernetics; Silver Spring, USA). Utilizou-se a ferramenta “*create trace feature*” para determinar os seguintes parâmetros: circunferência da cicatriz endocárdica (CCEN); circunferência da cicatriz epicárdica (CCEP); circunferência endocárdica do ventrículo esquerdo (CENVE); circunferência epicárdica do ventrículo esquerdo (CEPVE). O tamanho do infarto foi expresso como percentual e calculado segundo fórmula de Mulder et al. (2002)

$$(\text{CCEN} + \text{CCEP/CENVE} + \text{CEPVE}) \times 100$$

O tamanho do infarto foi calculado como a média total de 20 imagens por grupo infartado.

3.8. Isolamento dos cardiomiócitos

O isolamento dos cardiomiócitos foi realizado de acordo como descrito por Natali et al. (2001). A eutanásia de cada animal dos diferentes grupos experimentais foi realizada por decapitação, após o final de cada tratamento. Após eutanásia, o coração foi removido por toracotomia, e lavado em solução contendo 750 μL de CaCl_2 , para retirar o excesso de sangue, imediatamente antes da perfusão das soluções de isolamento. A seguir, a aorta ascendente foi fixada com um fio de sutura em uma agulha de aço inoxidável modificada (cânula), e o coração isolado foi colocado em um sistema de perfusão (*Langendorff* adaptado) e perfundido com solução de isolamento contendo 750 μL de CaCl_2 , em um fluxo constante até que os vasos coronários estivessem limpos. Em seguida, trocou-se a perfusão para solução livre de Ca^{2+} contendo 0,1 mM de ácido tetracético etilenoglicol (EGTA), durante 6 minutos, para o rompimento dos discos intercalares entre os miócitos e quelação de Ca^{2+} . Por fim, o coração foi perfundido com solução contendo 2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de colagenase tipo 2 (Worthington, EUA), 0,2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de protease (Sigma-Aldrich, EUA) e 100 μM de CaCl_2 durante 7-10 minutos para digestão das fibras colágenas extracelulares. Todas as soluções utilizadas no isolamento foram oxigenadas (O_2 100% - White Martins, Brasil) e mantidas a temperatura de 35-37°C.

Após perfusão, os ventrículos (direito e esquerdo) foram separados dos átrios e pesados em balança de precisão (Gehaka – Brasil, modelo AG200). O ventrículo direito foi removido e o ventrículo esquerdo foi aberto na região do septo interventricular. Os músculos papilares e o tecido conjuntivo foram removidos manualmente da superfície do ventrículo esquerdo. Nos animais infartados, somente a área remanescente ao infarto foi utilizada para o isolamento dos cardiomiócitos, sendo descartadas a área cicatrizada e a de risco. Os índices de hipertrofia ventricular foram calculados pela razão peso do ventrículo direito e esquerdo, respectivamente, pelo peso corporal de cada animal.

Em seguida, fragmentos do ventrículo esquerdo foram colocadas em frascos contendo 5 ml da solução enzimática (colagenase e protease). Os frascos foram agitados moderadamente durante 5 minutos em “banho-maria” à temperatura de 37°C, sendo o tecido cardíaco oxigenado. A seguir, o conteúdo dos frascos foi filtrado e centrifugado (3000 rpm)

por 30 segundos. O sobrenadante foi removido e os cardiomiócitos foram suspensos na solução de 750 μM de CaCl_2 . Os cardiomiócitos foram armazenados em placas de Petri em refrigerador (5°C) até serem utilizados.

3.9. Soluções de isolamento

As soluções de isolamento foram feitas usando-se uma solução básica com água ultrapura (Milli-Q) e a seguinte composição (em mM): NaCl (130) – 7,6 g/L; MgCl_2 (1,43) – 0,28 g/L; KCl (5,4) – 0,4 g/L; ácido etanosulfônico – hidroxietil piperazina (HEPES) (5) – 0,062 g/L, taurina (20) – 2,38 g/L; creatina (10) – 1,3 g/L; glicose (10) – 1,8 g/L; pH = 7,3; temperatura ambiente.

Solução A:

Para se fazer a solução de isolamento contendo Ca^{2+} , foram adicionados 375 μM de CaCl_2 (1 M) em 500 ml de solução básica.

Solução B:

Para a solução de isolamento livre de Ca^{2+} , foram adicionados 250 μM de EGTA (100 mM) em 250 ml de solução básica.

Solução C:

Para a solução enzimática de isolamento, foram adicionados 20 mg de colagenase, 2 mg de protease e 15 μL de CaCl_2 (100 mM) em 20 ml de solução básica.

3.9.1. Solução de perfusão Tampão HEPES

Durante as análises de contratilidade celular e transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, os cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo ou direito foram banhados com uma solução fisiológica contendo (mM): solução estoque: NaCl (130) – 65,99 g/L; HEPES (5) – 11,9 g/L; NaH_2PO_4 (1) – 1,42 g/L; MgSO_4 (1) – 2,46 g/L; KCl (5) – 3,72 g/L; solução sopa: Na acetato (20) – 1,64 g/100 mL; glicose (10) – 18,1 g/100 mL; insulina (5 u/L) – 0,5 g/100 mL. Para fazer um litro de solução de perfusão tampão HEPES, foram adicionados 100 mL da solução estoque, 10 mL da solução sopa 1 mL de CaCl_2 (1) em água deionizada ultrapura (Milli-Q). Esta solução foi equilibrada para um pH = 7,4 e mantida em temperatura ambiente.

3.10. Contratilidade Celular

A contratilidade dos cardiomiócitos isolados foram medidas através da técnica de alteração do comprimento celular usando-se o sistema de detecção de bordas (Ionoptix, EUA) montado num microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, EUA) equipado com uma lente objetiva de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, EUA), conforme descrito por Roman-Campos et al. (2009). Os cardiomiócitos isolados foram acomodados em uma câmara experimental giratória com a base de vidro montada no microscópio, e banhados pela solução de perfusão tampão HEPES em temperatura ambiente (~ 25°C). Foram visualizados em um monitor através de uma câmera (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada ao microscópio invertido, utilizando-se um programa de detecção de imagens (Ionwizard, Ionoptix, EUA) com uma frequência de 240 Hz.

Os cardiomiócitos foram estimulados externamente à frequência de 1 Hz (40 V, duração de 5 ms) utilizando-se um par de eletrodos de aço, acoplado nos dois lados internos da câmara, através de um estimulador elétrico (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, EUA). As bordas dos cardiomiócitos foram identificadas com duas janelas (direita e esquerda) e definidas através do ajuste de contraste (preto e branco) gerado pela qualidade da imagem projetada dos cardiomiócitos após a estimulação elétrica foram capturadas pelo sistema de detecção de bordas (Ionwizard, Ionoptix, EUA) e armazenadas para análise posterior (Figura 3).

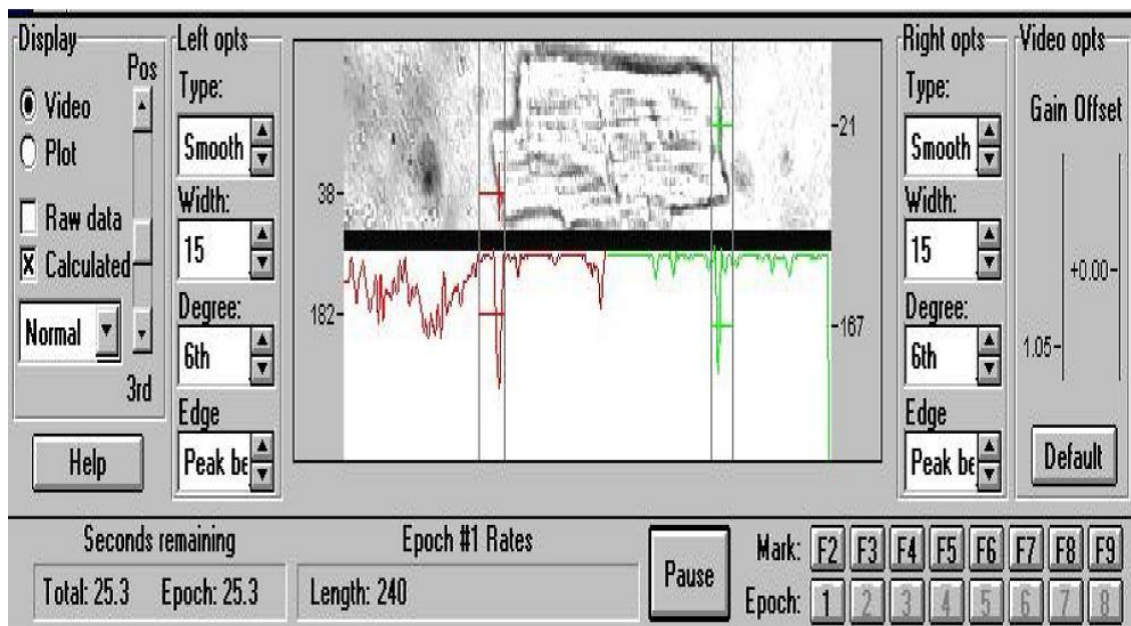


Figura 3. Representação do programa utilizado para aquisição das imagens e dos registros das contrações dos cardiomiócitos isolados. A definição das bordas direita e esquerda é projetada através dos picos verde e vermelho, respectivamente (CARNEIRO-JUNIOR, 2013).

Somente foram utilizados para os experimentos, os cardiomiócitos que estavam em boas condições, com as bordas (direita e esquerda) e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso, sem apresentar contrações involuntárias. Os registros foram feitos sempre até quatro horas após o isolamento dos cardiomiócitos e na temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$).

A partir das séries temporais de contração celular, obtidas usando o programa de registro (Ionoptix, EUA), os picos de contração foram detectados através de varredura dos pontos da série e comparação com um limiar. Esse limiar foi três vezes o desvio-padrão da série i.e., qualquer ponto maior que esse limiar foi considerado um ponto de máxima contração. Em torno dos pontos de máximo, os picos foram recortados, alinhados e promediados, sendo que o número mínimo de picos para promediação foi cinco. Em seguida, o início (ponto de deflexão da curva descendente do pico de contração) e o fim (ponto correspondente ao retorno da curva ascendente a condição basal) do pico de contração médio foram determinados através de inspeção visual. A partir da determinação dos pontos inicial e final o programa calculava automaticamente os valores das variáveis de contração celular, como amplitude de contração (variação do comprimento celular de repouso), tempo para o pico de contração (tempo compreendido desde a estimulação elétrica até o ponto de máxima contração, ms) e tempo para 50% do relaxamento (tempo compreendido desde a amplitude

máxima de contração até 50% do relaxamento, ms). Estas rotinas foram feitas usando o Matlab®.

Os parâmetros avaliados são demonstrados na Figura 4. Durante cada dia de experimento de contratilidade celular, foram analisados cardiomiócitos isolados de animais de um determinado grupo experimental e do seu respectivo grupo controle.

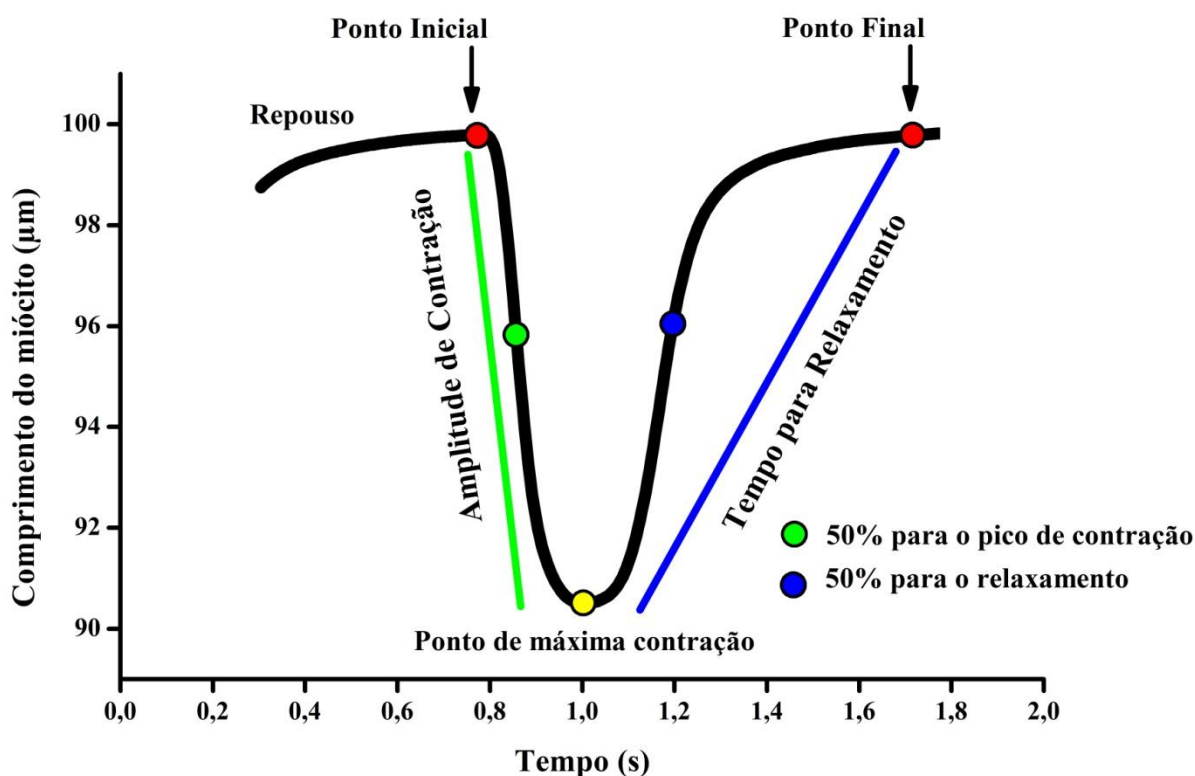


Figura 4. Traçado representativo de uma contração celular estimulada na frequência de 1 Hz, e os parâmetros avaliados.

3.11. Medidas do transiente de $[Ca^{2+}]_i$

As medidas do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo foram realizadas através de um microscópio de varredura a laser confocal (LSM 510 Meta, Zeiss GmbH, Alemanha) equipado com uma lente objetiva de imersão em óleo (Plan-Apo/1.4, 63x, Zeiss, Alemanha). Os cardiomiócitos foram incubados com o indicador fluorescente de Ca^{2+} , permeável à membrana plasmática, Fluo-4 acetoximetil-éster (Fluo-4 AM, Molecular Probes, Eugene, EUA), conforme descrito por Prímola-Gomes et al. (2009).

O Fluo-4 AM (5 μ M) foi preparado em uma solução de estoque a base de dimetilsulfóxido – DMSO (30 μ L de DMSO em 50 μ L de Fluo-4 AM). Adicionou-se 5 μ L de Fluo-4 AM/DMSO em 495 μ L de meio celular, durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após esse procedimento, os cardiomiócitos foram lavados e suspensos em solução tampão HEPES para remover o excesso de sonda fluorescente, acomodados em uma câmara experimental giratória com a base de vidro e banhados pela solução de perfusão tampão HEPES à temperatura ambiente. Quando esta sonda está ligada ao Ca²⁺ e é excitada a um comprimento de onda de 488 nm, emite um sinal de fluorescência medido a 510 nm, que se relaciona às variações sarcoplasmáticas de Ca²⁺. Tais variações foram expressas em relação à razão: F/F₀. Nas medidas dos transientes de [Ca²⁺]_i, F representa a média de fluorescência máxima após os estímulos, na fase sistólica do transiente, e F₀ representa a média de fluorescência mínima medida entre as contrações celulares, na fase diastólica do transiente.

Os transientes de [Ca²⁺]_i foram evocados por meio de estimulação de campo. Os cardiomiócitos foram estimulados eletricamente (Myopacer, Field Stimulator, Ionoptix, EUA) por um par de eletrodos de platina acoplado nos dois lados internos da câmara, com um pulso supra-limiar de 0,2 ms e 20 V (*voltage square pulse*), na frequência de 1Hz para produzir condições estacionárias. Os sinais de fluorescência foram obtidos por meio de varredura em linha (*Line Scan Mode*). A linha de varredura (512 *pixels*) foi posicionada aleatoriamente no eixo longitudinal da célula, com o cuidado de não cruzar regiões de núcleo. As varreduras foram feitas por meio de um laser de argônio (488 nm). As varreduras foram repetidas a cada 1,54 ms, sendo utilizada para a criação de imagens bidimensionais (tempo no eixo x e fluorescência no eixo y) (Figura 5).

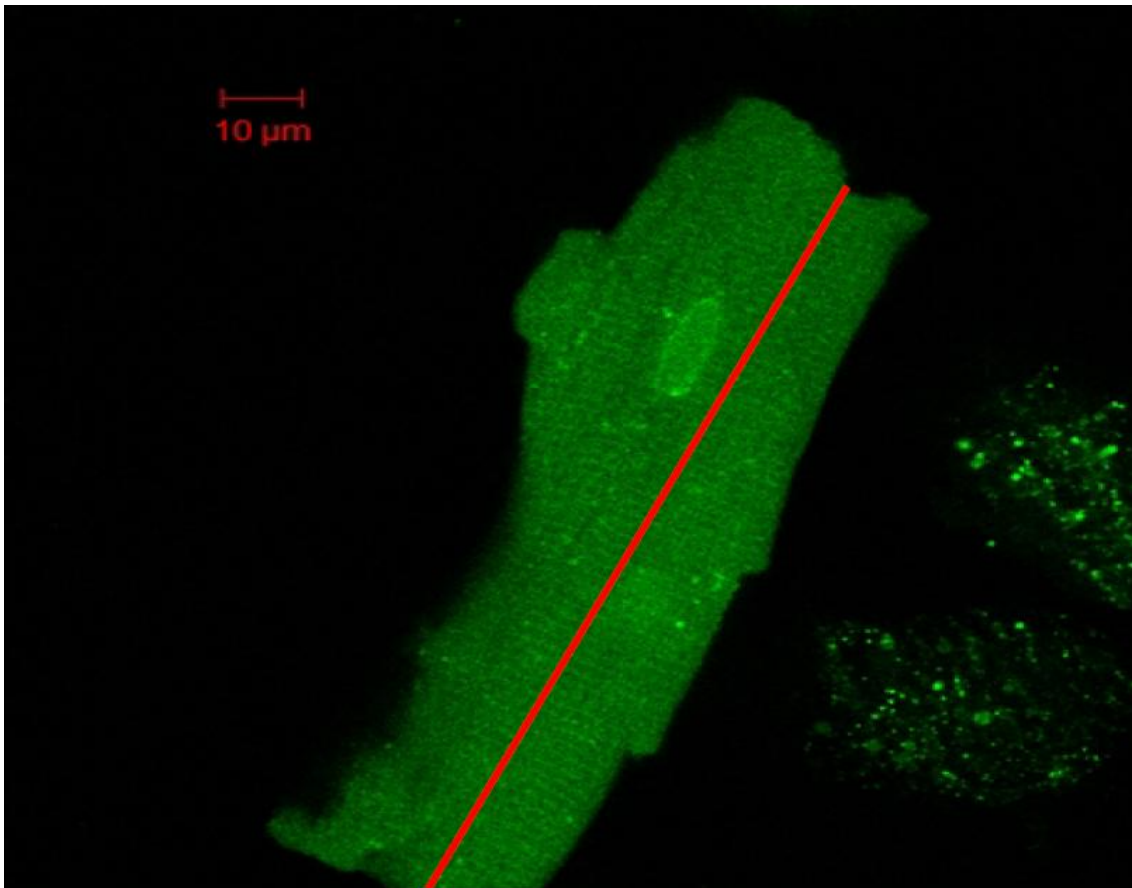


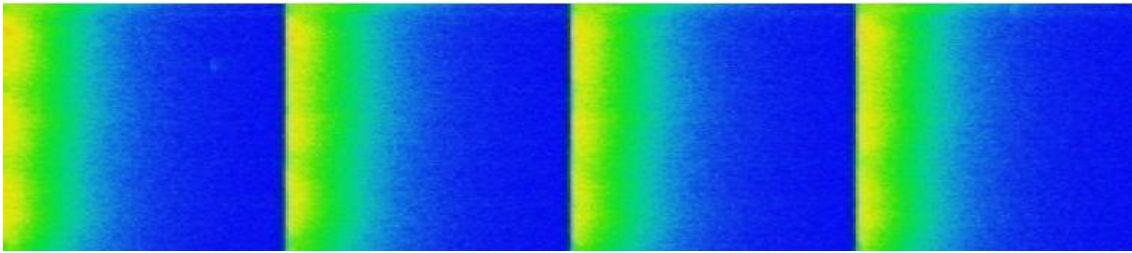
Figura 5. Cardiomiócito isolado incubado com o indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo-4 AM). A linha de varredura (vermelha) foi posicionada no eixo longitudinal da célula, com o cuidado de não cruzar regiões de núcleo (CARNEIRO-JUNIOR, 2013).

Foram utilizados somente os cardiomiócitos que estavam em boas condições, com as bordas (direita e esquerda) e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso, sem apresentar contrações involuntárias. Os registros foram sempre feitos até quatro horas após o isolamento dos cardiomiócitos e em temperatura ambiente (25°C).

As imagens obtidas foram processadas através de um software desenvolvido em plataforma MatLab[®]. As variáveis analisadas foram amplitude do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (F/F_0); tempo para o pico de transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (tempo compreendido desde a estimulação elétrica até a fluorescência máxima, ms) e tempo para 50% do decaimento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (tempo compreendido desde a fluorescência máxima até metade do retorno à fluorescência basal, ms).

Os parâmetros avaliados são demonstrados na Figura 6. Durante cada dia de experimento do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, foram analisados cardiomiócitos isolados de animais de um determinado grupo experimental e do seu respectivo grupo controle.

A)



B)

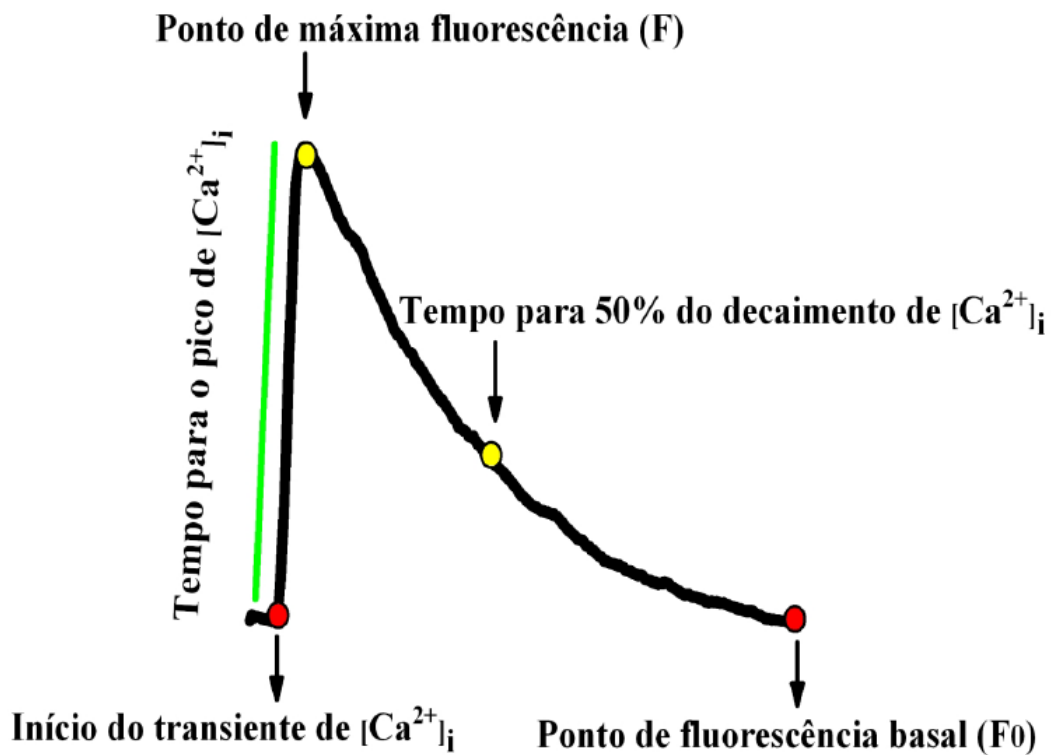


Figura 6. A) Traçados representativos das imagens de fluorescência para o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em cardiomiócitos isolados de ratos. B) Resultado da análise da imagem do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e os parâmetros avaliados (CARNEIRO-JUNIOR, 2013).

3.12. Expressão de proteínas cardíacas

A expressão das proteínas FLB_t (fosfolambam total), do NCX (canal trocador Na^+/Ca^{2+}), da SERCA2a (Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático) e da FLB_{ser16} (fosfolambam fosforilada na serina 16) nos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos

animais experimentais foram realizadas por meio da técnica de eletroforese de proteínas, *Western Blot*.

Inicialmente, as amostras do ventrículo esquerdo foram homogeneizadas através de um homogeneizador de tecidos Polytron (PowerGen 125, Fisher Scientific) em volumes correspondentes a cada amostra com tampão de extração (Manitol (210 mM; 19,1 g), Sacarose (70 mM; 12,0 g), MOPS (3-[N-morpholino] propanesulfonic acid) (5 mM; 0,523), EDTA (1 mM; 0,1861 g) e água destilada (500 mL)), acrescido de inibidor de protease (1:200) e inibidor de fosfatase (1:200). A homogeneização foi realizada por 30 segundos e o homogenato transferido para tubos de 1,5 ml. As amostras foram então centrifugadas por 20 minutos à 4°C a 12000 rpm, sendo o sobrenadante transferido para novo tubo de 1,5 ml. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Biorad, EUA). As alíquotas dos homogenatos foram então armazenadas em freezer -80°C até serem utilizadas.

As amostras foram diluídas em tampão de amostra. Para separação, foram aplicados 50µg de proteína em gel de SDS-PAGE. As proteínas presentes na amostra foram separadas eletroforéticamente em gel de SDS-poliacrilamida (10 e 15%, dependendo do peso molecular da proteína a ser estudada). Após serem separadas em gel, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (0,2 µm, Biorad, EUA) em tampão de transferência contendo Tris Base 48mM, Glicina 39mM, SDS 0,0375%, Metanol 20% e água 1000ml. Utilizou-se solução de Pounceau: ácido acético 1% para verificar se a transferência foi adequada. Logo após, as membranas foram lavadas com solução basal (TBS: Tris 10 mM pH 7,6 e NaCl 150 mM). O procedimento seguiu-se pela aplicação de solução para bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos, contendo TBS e albumina (2%), por 60 minutos em temperatura ambiente e agitação constante.

A membrana então foi incubada com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora (TBS e albumina 4%) a 4°C por 12 horas com agitação constante. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados, com as respectivas diluições: anticorpo policlonal para a FLBt (1:1000), anticorpo policlonal para a FLB_{ser16} (1:1000), anticorpo policlonal para SERCA 2a (1:1000), anticorpo monoclonal para o NCX (1:1000) e anticorpo monoclonal para GAPDH (1:10000). Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução TBS-T. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase em solução bloqueadora (TBS-T e albumina 4%) por uma hora e meia em temperatura ambiente com agitação constante. Os seguintes anticorpos secundários (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) foram utilizados, com as respectivas diluições: IgG anti-coelho (1:1000) ou anti-camundongo (1:1000). Após a incubação com o

anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução de TBS-T para remover o excesso de anticorpo. Por fim, a imuno-deteção das bandas protéicas foi realizada por meio do método de quimioluminescência (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ, EUA) e a intensidade das mesmas avaliadas por análise densitométrica através do software ImageJ.

A expressão das proteínas estudadas foi normalizada pela expressão de GAPDH da mesma amostra.

3.13. Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando o software SigmaPlot 11.0 e apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM).

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos mesmos. Para comparação entre o peso corporal inicial e o final foi utilizado o teste *t* pareado. Para a comparação do tamanho do infarto entre os quatro grupos experimentais infartados foi utilizada a ANOVA two-way, seguida do *post-hoc* de Tukey/. Para as comparações das demais variáveis entre os seis grupos experimentais foi utilizada a análise fatorial 2 (controle *vs* treinado) por 3 (infarto *vs* sham *vs* terapia celular), seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

4. RESULTADOS

Os resultados referentes aos efeitos do treinamento físico e do transplante de CTMs sobre o peso corporal, peso do coração, peso dos ventrículos, peso relativo do coração, peso relativo dos ventrículos, peso do ventrículo esquerdo, peso relativo do ventrículo esquerdo e peso do ventrículo direito dos animais são apresentados na Tabela 1. Observa-se que todos os animais ganharam peso corporal do início para o final do experimento, mas os tratamentos não afetaram esta variável.

No que diz respeito ao peso do coração, houve efeito do fator infarto (Infartados: $1,752 \pm 0,05$ vs Não Infartados: $1,472 \pm 0,05$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Não foi observado efeito do fator treinamento (Controle: $1,724 \pm 0,04$ vs Treinados: $1,648 \pm 0,04$), independente dos fatores IM e terapia celular. Além disso, não houve efeito da terapia celular (Tratados: $1,834 \pm 0,05$ vs Não tratados: $1,752 \pm 0,05$), independente dos fatores IM e treinamento. Não houve interação entre os fatores.

Em relação ao peso dos ventrículos, houve efeito do fator infarto (Infartados: $2,402 \pm 0,10$ vs Não Infartados: $1,850 \pm 0,11$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Não foi observado efeito do fator treinamento (Controle: $2,222 \pm 0,08$ vs Treinados: $2,187 \pm 0,09$), independente dos fatores IM e terapia celular. Ainda, não houve efeito da terapia celular (Tratados: $2,361 \pm 0,10$ vs Não tratados: $2,402 \pm 0,10$), independente dos fatores IM e treinamento. Não houve interação entre os fatores.

Quanto ao peso relativo dos ventrículos, houve efeito do fator infarto (Infartados: $0,00577 \pm 0,0002$ vs Não Infartados: $0,00464 \pm 0,0002$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Não foi observado efeito do fator treinamento (Controle: $0,00539 \pm 0,0001$ vs Treinados: $0,00539 \pm 0,0002$), independente dos fatores IM e terapia celular. Além disso, não houve efeito da terapia celular (Tratados: $0,00577 \pm 0,0002$ vs Não tratados: $0,00577 \pm 0,0002$), independente dos fatores IM e treinamento. Não houve interação entre os fatores.

Já em relação ao peso do ventrículo esquerdo, houve efeito do fator infarto (Infartados: $1,512 \pm 0,503$ vs Não Infartados: $1,213 \pm 0,0504$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Não foi observado efeito do fator treinamento (Controle: $1,451 \pm 0,0394$ vs Treinados: $1,387 \pm 0,0428$), independente dos fatores IM e terapia celular. Ainda, não houve efeito da terapia celular (Tratados: $1,531 \pm 0,0504$ vs Não tratados: $1,512 \pm 0,0503$), independente dos fatores IM e treinamento. Não houve interação entre os fatores.

Portanto, observou-se que a associação dos tratamentos não afetou as variáveis apresentadas na tabela 1.

Tabela 1: Peso corporal, peso do coração, peso dos ventrículos e peso relativo dos ventrículos e do coração.

	CON SH	TR SH	CON IM	TR IM	CON IM CT	TR IM CT
PC Inicial (g)	140 ± 3,45	146 ± 4,05	148 ± 5,16	150 ± 6,14	148 ± 3,29	143 ± 4,39
PC Final (g)	387 ± 12,3 [#]	406 ± 11,48 [#]	422 ± 8,36 [#]	396 ± 20,50 [#]	419 ± 10,03 [#]	396 ± 14,02 [#]
Peso Coração (g)	1,42 ± 0,07	1,51 ± 0,04	1,82 ± 0,08 [*]	1,67 ± 0,04	1,91 ± 0,08 [*]	1,75 ± 0,06
Peso Coração/PC (mg/g)	3,70 ± 0,11	3,74 ± 0,15	4,32 ± 0,16	4,62 ± 0,36	4,58 ± 0,20 [*]	4,46 ± 0,15 [§]
PV (g)	1,78 ± 0,11	1,91 ± 0,15	2,52 ± 0,10 [*]	2,17 ± 0,04	2,35 ± 0,20	2,36 ± 0,18
PV/PC (mg/g)	4,60 ± 0,24	4,68 ± 0,26	6,00 ± 0,28 [*]	5,55 ± 0,27	5,59 ± 0,43	5,95 ± 0,39
PVE (g)	1,18 ± 0,05	1,24 ± 0,06	1,60 ± 0,06 [*]	1,41 ± 0,04	1,56 ± 0,09 [*]	1,50 ± 0,07
PVE/PC (mg/g)	3,06 ± 0,14	3,05 ± 0,12	3,82 ± 0,18	3,95 ± 0,41	3,71 ± 0,23	3,80 ± 0,18 [§]

Dados são média ± EPM de 6 a 8 animais por grupo experimental. CON SH, Controle Sham. CON IM, Controle Infartado. CON IM CT, Controle Infartado + CTMs. TR SH, Treinado Sham. TR IM, Treinado Infartado. TR IM CT, Treinado Infartado + CTMs. PC Inicial, Peso Corporal Inicial. PC Final, Peso Corporal Final. PV, Peso dos Ventrículos. PV/PC, Peso dos ventrículos pelo peso corporal. PVE, Peso do ventrículo esquerdo. PVE/PC, Peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal final. PVD, peso do ventrículo direito. ^{*}: significativamente diferente para o grupo CON SH; [§]: significativamente diferente para o grupo TR SH; [#] significativamente diferente para o PC Inicial do mesmo grupo.

A Figura 7 mostra fotomicrografias representativas do tamanho do infarto e a Tabela 2 a quantificação do infarto nos grupos experimentais.

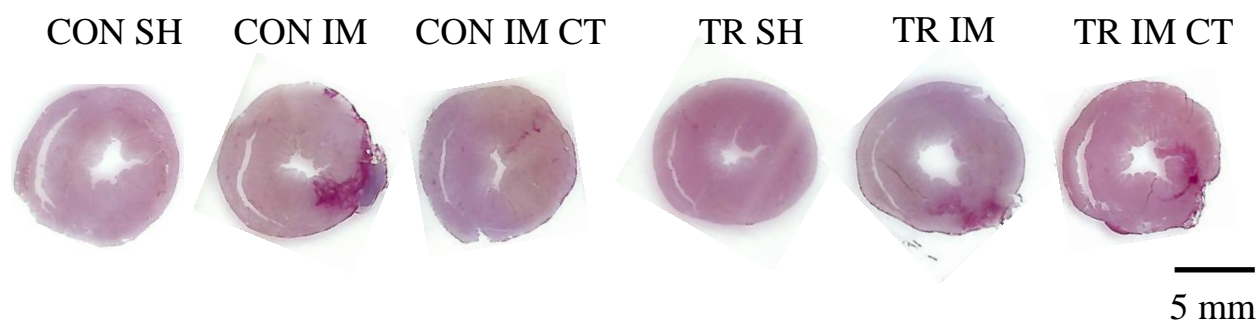


Figura 7: Fotomicrografias representativas da parte medial dos corações em corte transversal corados com *picro sirius red*. A região infartada apresenta-se corada em vermelho. CON SH, Controle Sham. CON IM, Controle Infartado. CON IM CT, Controle Infartado + CTMs. TR SH, Treinado Sham. TR IM, Treinado Infartado. TR IM CT, Treinado Infartado + CTMs.

Tabela 2: Tamanho do Infarto do miocárdio experimental.

	CON SH	CON IM	CON IM CT	TR SH	TR IM	TR IM CT
IM (%)	–	30,39 ± 2,32	15,00 ± 2,76 [‡]	–	21,33 ± 2,55 [*]	23,85 ± 2,32 [*]

Dados são média ± EPM de 6 animais por grupo experimental. CON SH, Controle Sham. CON IM, Controle Infartado. CON IM CT, Controle Infartado + CTMs. TR SH, Treinado Sham. TR IM, Treinado Infartado. TR IM CT, Treinado Infartado + CTMs. IM, Infarto do miocárdio. ^{*} diferença para os respectivos grupos controles. [‡] diferença para o grupo CON IM.

Em relação ao tamanho do infarto, houve efeito do fator terapia celular e treinamento. Os corações dos animais do grupo CON IM CT tiveram menor área de infarto em relação aos do grupo CON IM. O treinamento físico aeróbio de baixa intensidade também foi capaz de reduzir o tamanho do infarto nos animais do grupo TR IM, quando comparados aos do grupo CON IM. Por outro lado, a associação dos tratamentos não conseguiu diminuir ainda mais o tamanho do infarto nos animais do grupo TR IM CT, em relação aos do grupo CON IM CT, ou aos do grupo TR IM.

Os resultados do teste de desempenho dos animais ao final do experimento são apresentados na Figura 8. Observa-se que houve efeito do fator treinamento, independente dos

fatores infarto e terapia celular. O tempo total de exercício até a fadiga (TTF) aumentou em todos os grupos treinados, quando comparados aos respectivos grupos controles, indicando aumento da capacidade física provocada pelo treinamento físico aeróbio. Porém, não houve efeito independente dos fatores infarto e terapia celular. Também, não houve efeito da associação dos dois tratamentos.

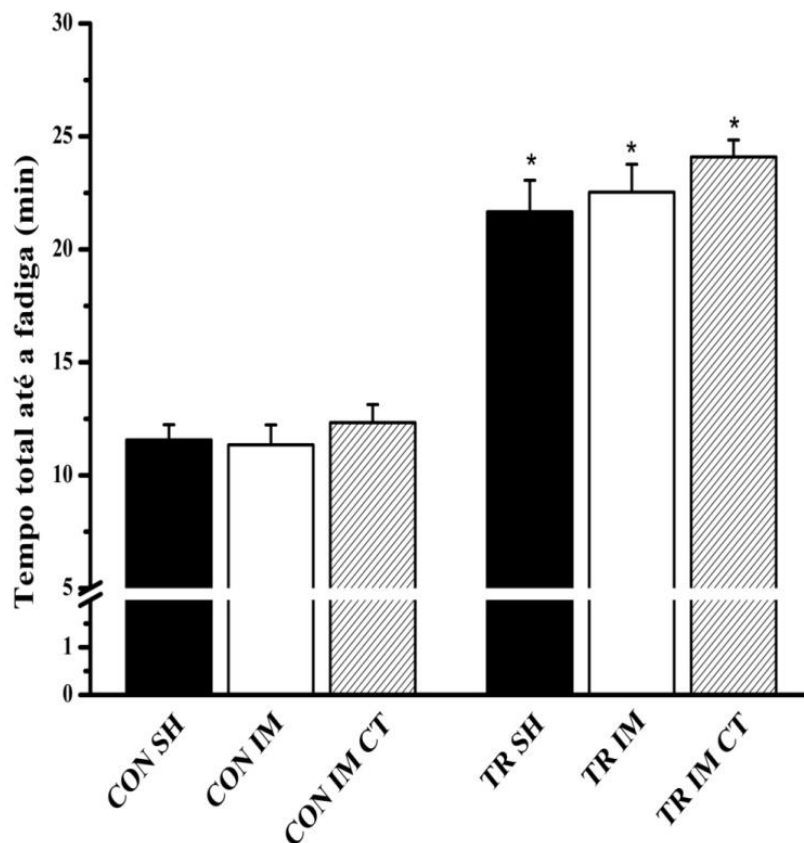


Figura 8: Tempo total de exercício até a fadiga dos animais experimentais após os tratamentos. CON SH, Controle Sham. CON IM, Controle Infartado. CON IM CT, Controle Infartado + CTMs. TR SH, Treinado Sham. TR IM, Treinado Infartado. TR IM CT, Treinado Infartado + CTMs. Dados são média \pm EPM de 13 – 15 ratos por grupo. * significativamente diferentes dos seus controles.

Os resultados referentes aos dados ecocardiográficos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Dados ecocardiográficos do ventrículo esquerdo.

	CON SH	TR SH	CON IM	TR IM	CON IM CT	TR IM CT
DDVE (mm)	6,486 ± 0,387 [†]	6,554 ± 0,197	8,126 ± 0,384	7,536 ± 0,355	7,914 ± 0,327	8,119 ± 0,222 [§]
DSVE (mm)	4,212 ± 0,344 [†]	3,785 ± 0,239 ^Φ	6,441 ± 0,440	5,425 ± 0,268 [‡]	5,681 ± 0,324	5,890 ± 0,196
EPPVEd (mm)	1,669 ± 0,0918	1,698 ± 0,0682	1,863 ± 0,100	2,122 ± 0,174 [§]	1,848 ± 0,0890	1,881 ± 0,126
EPPVEs (mm)	2,583 ± 0,149	2,917 ± 0,0820	2,507 ± 0,105	3,303 ± 0,224 ^{‡§}	2,756 ± 0,0833	2,733 ± 0,142
EDSIV (mm)	1,767 ± 0,148	1,683 ± 0,133	1,406 ± 0,105	1,600 ± 0,0807	1,371 ± 0,115	1,549 ± 0,0889
ESSIV (mm)	2,540 ± 0,192	2,900 ± 0,253	1,933 ± 0,126 [*]	2,486 ± 0,101 [‡]	2,348 ± 0,170	2,500 ± 0,179
Fração de ejeção (%)	69,929 ± 2,884 [†]	75,208 ± 1,155 ^Φ	48,148 ± 3,717	59,750 ± 1,714 [‡]	60,190 ± 2,387 [‡]	58,810 ± 1,538
Fração de encurtamento (%)	35,238 ± 2,144 [†]	39,146 ± 1,069 ^Φ	21,519 ± 1,959	28,111 ± 1,154 [‡]	28,357 ± 1,477 [‡]	27,381 ± 0,988

Dados são média ± EPM de 6 a 9 animais por grupo experimental. CON SH, Controle Sham. CON IM, Controle Infartado. CON IM CT, Controle Infartado + CTMs. TR SH, Treinado Sham. TR IM, Treinado Infartado. TR IM CT, Treinado Infartado + CTMs. DDVE, diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo. DSVE, diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo. EPPVEd, espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo. EPPVEs, espessura sistólica da parede posterior do ventrículo esquerdo. EDSIV, espessura diastólica septo interventricular. ESSIV, espessura sistólica septo interventricular. [†]: significativamente diferente para os grupos CON IM e CON IM CT. [§]: significativamente diferente para o grupo TR SH. ^Φ: diferença para os grupos TR IM e TR IM CT. [‡]: significativamente diferente para o grupo CON IM. ^{*}: significativamente diferente para o grupo CON SH.

Quanto ao DDVE, houve efeito do fator infarto (Infartados: $7,831 \pm 0,232$ vs Não Infartados: $6,520 \pm 0,228$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Não foi observado efeito do fator treinamento (Controle: $7,509 \pm 0,185$ vs Treinados: $7,403 \pm 0,193$), independente dos fatores IM e terapia celular. Além disso, não houve efeito da terapia celular (Tratados: $8,017 \pm 0,235$ vs Não tratados: $7,831 \pm 0,232$), independente dos fatores IM e treinamento. Não houve interação entre os fatores.

No que diz respeito ao DSVE, houve efeito do fator infarto (Infartados: $5,933 \pm 0,235$ vs Não Infartados: $3,999 \pm 0,231$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Não foi verificado efeito do fator treinamento (Controle: $5,445 \pm 0,188$ vs Treinados: $5,034 \pm 0,196$), independente dos fatores IM e terapia celular. Não houve efeito da terapia celular (Tratados: $5,786 \pm 0,239$ vs Não tratados: $5,933 \pm 0,235$), independente dos fatores IM e treinamento. Não houve interação entre os fatores.

Em relação à fração de ejeção, houve efeito do fator infarto (Infartados: $53,949 \pm 1,837$ vs Não Infartados: $72,568 \pm 1,803$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Foi observado efeito do fator treinamento (Controle: $59,422 \pm 1,463$ vs Treinados: $64,589 \pm 1,531$), independente dos fatores IM e terapia celular. Além disso, houve efeito da terapia celular (Tratados: $59,500 \pm 1,863$ vs Não tratados: $53,949 \pm 1,837$), independente dos fatores IM e treinamento. Porém, não houve interação entre os fatores.

Quanto à fração de encurtamento, houve efeito do fator infarto (Infartados: $24,815 \pm 1,136$ vs Não Infartados: $37,192 \pm 1,115$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Não foi verificado efeito do fator treinamento (Controle: $28,371 \pm 0,905$ vs Treinados: $31,546 \pm 0,947$), independente dos fatores IM e terapia celular. Ainda, não houve efeito da terapia celular (Tratados: $27,869 \pm 1,152$ vs Não tratados: $24,815 \pm 1,136$), independente dos fatores IM e treinamento. Não houve interação entre os fatores.

Em relação à EPPVEd, houve efeito do fator infarto (Infartados: $1,993 \pm 0,0770$ vs Não Infartados: $1,683 \pm 0,0756$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Não foi observado efeito do fator treinamento (Controle: $1,793 \pm 0,0614$ vs Treinados: $1,900 \pm 0,0642$), independente dos fatores IM e terapia celular. Além disso, não houve efeito da terapia celular (Tratados: $1,864 \pm 0,0781$ vs Não tratados: $1,993 \pm 0,0770$), independente dos fatores IM e treinamento. Não houve interação entre os fatores.

Já em relação à EPPVEs, houve efeito do fator infarto (Infartados: $2,905 \pm 0,0939$ vs Não Infartados: $2,750 \pm 0,0922$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Não foi observado efeito do fator treinamento (Controle: $2,594 \pm 0,0748$ vs Treinados: $2,984 \pm$

0,0783), independente dos fatores IM e terapia celular. Além disso, não houve efeito da terapia celular (Tratados: $2,712 \pm 0,0953$ vs Não tratados: $2,905 \pm 0,0939$), independente dos fatores IM e treinamento. Não houve interação entre os fatores.

No que diz respeito à EDSIV, não houve efeito do fator infarto (Infartados: $1,503 \pm 0,0832$ vs Não Infartados: $1,725 \pm 0,0817$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Não foi verificado efeito do fator treinamento (Controle: $1,515 \pm 0,0663$ vs Treinados: $1,611 \pm 0,0694$), independente dos fatores IM e terapia celular. Não houve efeito da terapia celular (Tratados: $1,460 \pm 0,0844$ vs Não tratados: $1,503 \pm 0,0832$), independente dos fatores IM e treinamento. Não houve interação entre os fatores.

Quanto ao DDVE, houve efeito do fator infarto (Infartados: $7,831 \pm 0,232$ vs Não Infartados: $6,520 \pm 0,228$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Não foi observado efeito do fator treinamento (Controle: $7,509 \pm 0,185$ vs Treinados: $7,403 \pm 0,193$), independente dos fatores IM e terapia celular. Além disso, não houve efeito da terapia celular (Tratados: $8,017 \pm 0,235$ vs Não tratados: $7,831 \pm 0,232$), independente dos fatores IM e treinamento. Não houve interação entre os fatores.

Em relação à ESSIV, houve efeito do fator infarto (Infartados: $2,210 \pm 0,129$ vs Não Infartados: $2,720 \pm 0,127$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Foi observado efeito do fator treinamento (Controle: $2,274 \pm 0,103$ vs Treinados: $2,629 \pm 0,108$), independente dos fatores IM e terapia celular. Além disso, não houve efeito da terapia celular (Tratados: $2,424 \pm 0,131$ vs Não tratados: $2,210 \pm 0,129$), independente dos fatores IM e treinamento. Não houve interação entre os fatores.

O DDVE, o DSVE, a fração de ejeção e a fração de encurtamento foram maiores no grupo CON SH, quando comparados aos grupos CON IM e CON IM CT, evidenciando o efeito negativo do IM sobre essas variáveis. Os animais do grupo CON IM, também diminuíram a ESSIV em relação aos animais sham. Houve aumento na fração de ejeção e fração de encurtamento, com redução do DSVE no coração dos ratos do grupo TR SH, comparado com os demais grupos treinados. O treinamento físico aplicado nos animais infartados foi capaz de restaurar a fração de ejeção, a fração de encurtamento, a EPPVEs e a ESSIV. Verificou-se ainda, aumentos do EPPVEs e do EPPVEd nos animais do grupo TR IM, comparados com os do grupo TR SH.

O transplante de CTMs por sua vez, aumentou a fração de ejeção e de encurtamento, com relação ao grupo CON IM. O DDVE dos animais que treinaram e receberam células-tronco, apresentou-se aumentada em relação ao grupo TR SH.

Portanto, observou-se que a associação dos tratamentos não afetou as variáveis apresentadas na tabela 2.

A Figura 9 apresenta os resultados dos parâmetros mecânicos celulares analisados nos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos animais experimentais.

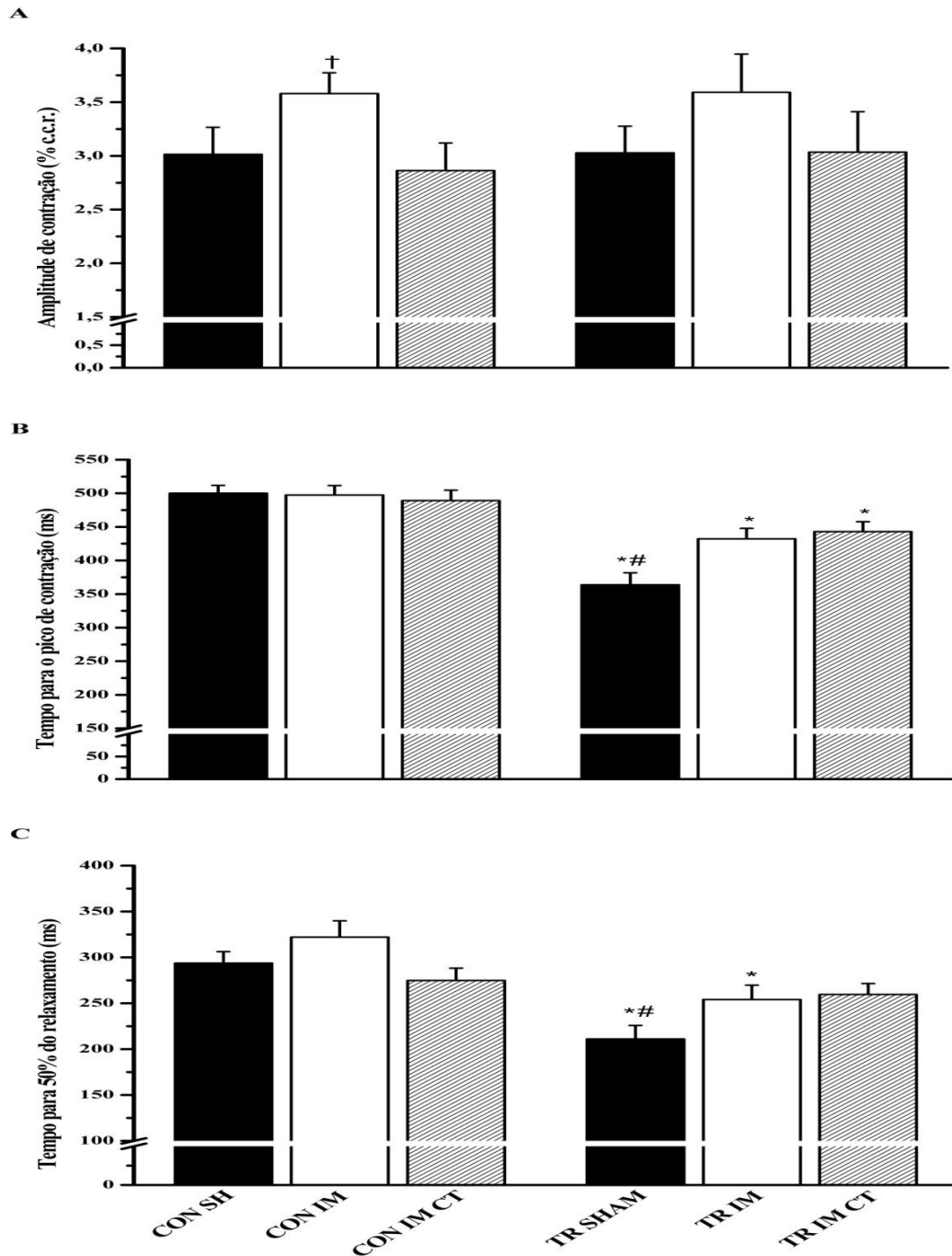


Figura 9. Contratilidade dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais experimentais. (A) Amplitude de contração (% c.c.r. - comprimento celular de repouso). (B) Tempo para o pico de contração celular (ms). (C) Tempo para 50% do relaxamento celular (ms). CON SH, Controle Sham. CON IM, Controle Infartado. COM IM CT, Controle Infartado + CTMs. TR SHAM, Treinado Sham. TR IM, Treinado Infartado. TR IM CT, Treinado Infartado + CTMs. Dados são média \pm EPM de 50-70 células em cada grupo.

*significativamente diferentes do respectivo controle; † significativamente diferente dos demais grupos controle; # significativamente diferente dos grupos treinados.

Quanto à amplitude de contração celular (Figura 9A), houve efeito do fator infarto (Infartados: $3,585 \pm 0,205$ vs Não Infartados: $3,021 \pm 0,213$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Não foi observado efeito do fator treinamento (Controle: $3,152 \pm 0,169$ vs Treinados: $3,217 \pm 0,168$), independente dos fatores IM e terapia celular. Além disso, houve efeito da terapia celular (Tratados: $2,948 \pm 0,202$ vs Não tratados: $3,585 \pm 0,205$), independente dos fatores IM e treinamento. Não houve interação entre os fatores. Verificou-se aumento na amplitude dos cardiomiócitos dos animais do grupo CON IM em relação aos dos grupos CON SH e CON IM CT. O treinamento de corrida de baixa intensidade não foi eficaz para aumentar esse parâmetro em nenhum dos grupos exercitados (Figura 9A).

No que diz respeito ao tempo para o pico de contração (Figura 9B), houve efeito do fator infarto (Infartados: $465 \pm 10,3$ vs Não Infartados: $432 \pm 10,9$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Foi verificado efeito do fator treinamento (Controle: $495 \pm 8,73$ vs Treinados: $413 \pm 8,71$), independente dos fatores IM e terapia celular. Houve efeito da terapia celular (Tratados: $466 \pm 10,9$ vs Não tratados: $465 \pm 10,3$), independente dos fatores IM e treinamento. Além disso, houve interação entre os fatores. Os cardiomiócitos dos grupos treinados apresentaram diminuição no tempo para o pico de contração celular em todos os grupos treinados, comparados aos seus pares controles. Os cardiomiócitos do grupo TR SH apresentaram menor tempo para o pico de contração celular do que os dos grupos TR IM e TR IM CT (Figura 9B).

Em relação ao tempo para 50% do relaxamento (Figura 9C), houve efeito do fator infarto (Infartados: $290,133 \pm 9,854$ vs Não Infartados: $252,414 \pm 10,828$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Foi observado efeito do fator treinamento (Controle: $296,855 \pm 8,700$ vs Treinados: $242,947 \pm 8,749$), independente dos fatores IM e terapia celular. Além disso, houve efeito da terapia celular (Tratados: $267,156 \pm 11,321$ vs Não tratados: $290,133 \pm 9,854$), independente dos fatores IM e treinamento. Porém, não houve interação entre os fatores. O programa de treinamento físico foi capaz de reduzir o tempo para 50% do relaxamento celular nos animais dos grupos TR SH e TR IM em relação aos seus controles. Os animais do grupo TR SH apresentaram menor tempo para 50% do relaxamento, quando comparados aos animais dos grupos TR IM e TR IM CT (Figura 9C).

Portanto, observou-se que a associação dos tratamentos não afetou as variáveis apresentadas na figura 9.

Os dados referentes às análises do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ dos cardiomiócitos isolados dos animais são apresentados na Figura 10.

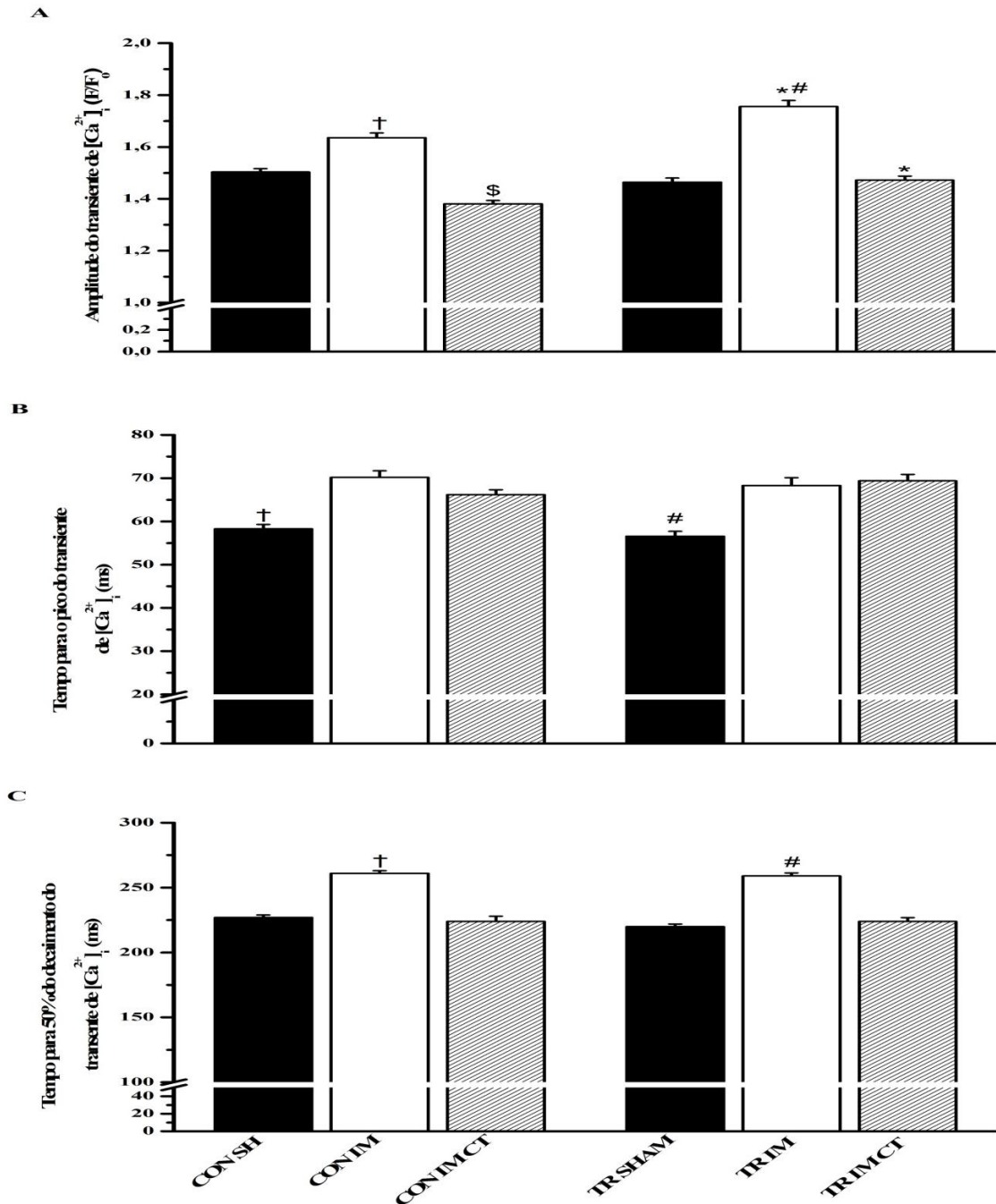


Figura 10. Transiente de $[Ca^{2+}]_i$ dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais experimentais. (A) Amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (F/F₀). (B) Tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (ms). (C) Tempo para 50% do decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$. CON SH, Controle Sham. CON IM, Controle Infartado. COM IM CT, Controle Infartado + CTMs. TR SH, Treinado Sham. TR IM, Treinado Infartado. TR IM CT, Treinado Infartado + CTMs. Dados são média ± EPM de 4 a 6 corações por grupo. * significativamente diferentes

dos respectivos controles; † significativamente diferente dos demais grupos controles; # significativamente diferente dos grupos treinados; § significativamente diferente do grupo CON SH.

Quanto à amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 10A), houve efeito do fator infarto (Infartados: $1,672 \pm 0,0107$ vs Não Infartados: $1,484 \pm 0,0103$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Foi observado efeito do fator treinamento (Controle: $1,491 \pm 0,00855$ vs Treinados: $1,564 \pm 0,00958$), independente dos fatores IM e terapia celular. Além disso, houve efeito da terapia celular (Tratados: $1,427 \pm 0,0122$ vs Não tratados: $1,672 \pm 0,0107$), independente dos fatores IM e treinamento. Houve interação entre os fatores. Nos cardiomiócitos dos animais do grupo CON IM, verificou-se aumento na amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em relação aos demais grupos controles, assim como a amplitude no grupo CON IM CT foi reduzida em relação aos grupos CON SHAM e CON IM. O treinamento físico aumentou esse parâmetro nos cardiomiócitos do grupo TR IM, quando comparados aos controles. O grupo TR IM apresentou maior amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ do que os demais grupos treinados (Figura 10A).

No que diz respeito ao tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 10B), houve efeito do fator infarto (Infartados: $69,2 \pm 0,967$ vs Não Infartados: $57,4 \pm 0,0103$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Não foi verificado efeito do fator treinamento (Controle: $64,9 \pm 0,776$ vs Treinados: $64,7 \pm 0,886$), independente dos fatores IM e terapia celular. Não houve efeito da terapia celular (Tratados: $67,8 \pm 1,13$ vs Não tratados: $69,2 \pm 0,967$), independente dos fatores IM e treinamento. Além disso, não houve interação entre os fatores. O tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ foi reduzido nos cardiomiócitos dos animais CON SH em relação aos outros grupos controles. Da mesma forma, os cardiomiócitos do grupo TR SH também diminuíram o tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, quando comparados aos demais grupos treinados (Figura 10B).

Em relação ao tempo para 50% do relaxamento (Figura 10C), houve efeito do fator infarto (Infartados: $260 \pm 1,78$ vs Não Infartados: $224 \pm 1,70$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Não foi observado efeito do fator treinamento (Controle: $237 \pm 1,35$ vs Treinados: $235 \pm 1,59$), independente dos fatores IM e terapia celular. Além disso, não houve efeito da terapia celular (Tratados: $224 \pm 1,93$ vs Não tratados: $260 \pm 1,78$), independente dos fatores IM e treinamento. Não houve interação entre os fatores. Os animais do grupo CON IM tiveram maior tempo para 50% do decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ do que os do grupo CON SH e CON IM CT. O treinamento físico conseguiu diminuir esse

parâmetro nos animais SHAM. Já os cardiomiócitos dos animais TR IM tiveram maior tempo para o decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ em relação aos dos demais grupos exercitados (Figura 10C).

Portanto, observou-se que a associação dos tratamentos não afetou as variáveis apresentadas na Figura 9.

A Figura 11 apresenta os dados referentes à expressão das proteínas que regulam o relaxamento celular e seu normalizador para todos os grupos experimentais.

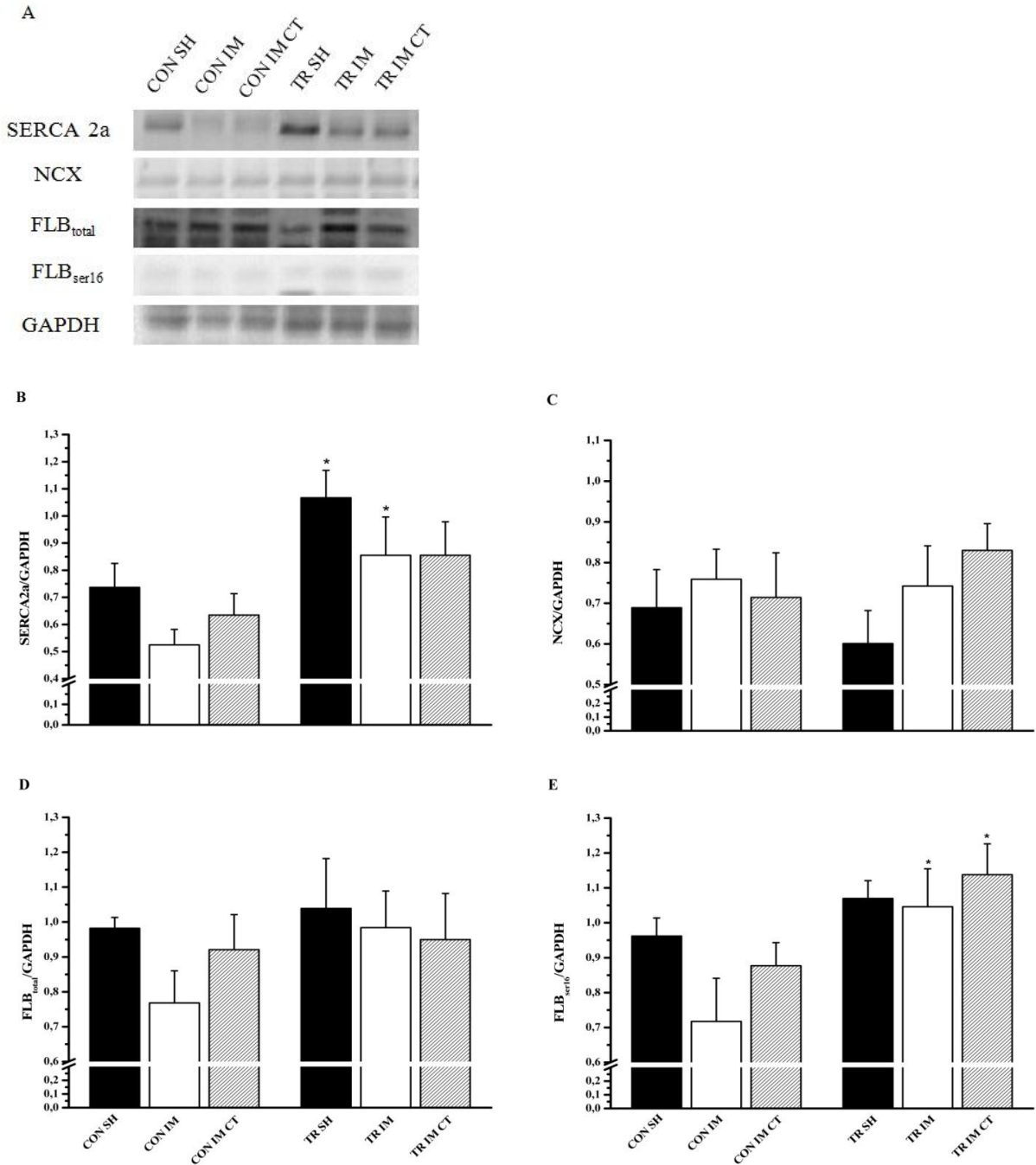


Figura 11. Expressão proteica no ventrículo esquerdo dos animais experimentais. (A) Imagem representativa das bandas das proteínas analisadas. (B) Ca^{2+} ATPase do retículo

sarcoplasmático (SERCA 2a). (C) Canal trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). (D) Fosfolambam fosforilada na serina 16 ($\text{FLB}_{\text{ser16}}$). (E) Fosfolambam total ($\text{FLB}_{\text{total}}$). CON SH, Controle Sham. CON IM, Controle Infartado. COM IM CT, Controle Infartado + CTMs. TR SH, Treinado Sham. TR IM, Treinado Infartado. TR IM CT, Treinado Infartado + CTMs. * significativamente diferente do seu respectivo controle.

Quanto à expressão de SERCA 2a (Figura 11B), não houve efeito do fator infarto (Infartados: $0,711 \pm 0,0671$ vs Não Infartados: $0,902 \pm 0,0735$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Foi observado efeito do fator treinamento (Controle: $0,646 \pm 0,0544$ vs Treinados: $0,931 \pm 0,0580$), independente dos fatores IM e terapia celular. Além disso, não houve efeito da terapia celular (Tratados: $0,754 \pm 0,0658$ vs Não tratados: $0,711 \pm 0,0671$), independente dos fatores IM e treinamento. Não houve interação entre os fatores. Verificou-se aumento da expressão de SERCA 2a no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos TR SH e TR IM, quando comparados aos seus respectivos grupos controles (Figura 11B).

No que diz respeito à expressão de NCX (Figura 11C), não houve efeito do fator infarto (Infartados: $0,750 \pm 0,0617$ vs Não Infartados: $0,645 \pm 0,0644$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Não foi verificado efeito do fator treinamento (Controle: $0,721 \pm 0,0526$ vs Treinados: $0,724 \pm 0,0511$), independente dos fatores IM e terapia celular. Não houve efeito da terapia celular (Tratados: $0,772 \pm 0,0644$ vs Não tratados: $0,750 \pm 0,0617$), independente dos fatores IM e treinamento. Além disso, não houve interação entre os fatores.

Em relação à expressão de $\text{FLB}_{\text{total}}$ (Figura 11D), não houve efeito do fator infarto (Infartados: $0,927 \pm 0,0499$ vs Não Infartados: $0,952 \pm 0,0499$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Não foi observado efeito do fator treinamento (Controle: $0,958 \pm 0,0424$ vs Treinados: $0,949 \pm 0,0424$), independente dos fatores IM e terapia celular. Além disso, não houve efeito da terapia celular (Tratados: $0,982 \pm 0,0558$ vs Não tratados: $0,927 \pm 0,0499$), independente dos fatores IM e treinamento. Não houve interação entre os fatores.

Quanto à expressão de $\text{FLB}_{\text{ser16}}$ (Figura 11E), não houve efeito do fator infarto (Infartados: $0,882 \pm 0,0609$ vs Não Infartados: $0,996 \pm 0,0578$), independente dos fatores treinamento e terapia celular. Foi verificado efeito do fator treinamento (Controle: $0,852 \pm 0,0481$ vs Treinados: $1,072 \pm 0,0481$), independente dos fatores IM e terapia celular. Além disso, não houve efeito da terapia celular (Tratados: $1,008 \pm 0,0609$ vs Não tratados: $0,882 \pm 0,0609$), independente dos fatores IM e treinamento. Não houve interação entre os fatores. A

expressão de FLB_{ser16} foi aumentada nos grupos TR IM e TR IM CT, em relação aos seus respectivos controles (Figura 11E).

Portanto, observou-se que a associação dos tratamentos não afetou as variáveis apresentadas na Figura 11.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho investigou os efeitos do treinamento físico aeróbio com corrida em esteira de baixa intensidade associado à terapia com células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea sobre parâmetros cardiovasculares e propriedades mecânicas de cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo de ratos com infarto do miocárdio experimental.

Em suma, o presente estudo mostrou que o programa de treinamento físico aplicado, foi capaz de aumentar a capacidade física aeróbia dos animais. Além disso, o treinamento físico atenuou as alterações do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, melhorou a contratilidade dos cardiomiócitos e aumentou a expressão proteica de SERCA 2a nos animais controle. O IM causou hipertrofia patológica verificada através dos índices hipertróficos (aumento do Peso do coração, PV, PV/PC, e PVE) e ecocardiográficos (aumento do DDVE e DSVE, e diminuição da ESSIV), além de disfunção cardíaca (redução da fração de ejeção e fração de encurtamento) e danos na contratilidade celular e no transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (aumento da amplitude de contração e do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, tempo para 50% do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$). O treinamento físico e o transplante com CTMs, quando utilizados isoladamente, conseguiram atenuar, em parte, as alterações estabelecidas pelo IM. O treinamento físico diminuiu o DSVE e aumentou a ESSIV, EPPVEs, fração de ejeção e fração de encurtamento, além de reduzir o tempo para o pico de contração e o tempo para 50% do relaxamento e aumentar a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e a expressão de SERCA2a e FLB_{ser16} . O tratamento por meio das CTMs, aumentou a fração de ejeção e a fração de encurtamento, assim como diminuiu a amplitude de contração e do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e o tempo para 50% do transiente de $[Ca^{2+}]_i$. A associação entre treinamento físico e CTMs melhorou alguns parâmetros celulares (menor amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e tempo para 50% do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, em relação aos animais apenas treinados; menor tempo para o pico de contração e maior amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e expressão de FLB_{ser16} , em relação aos animais apenas tratados com CTMs), porém esses benefícios não foram suficientes para gerarem modificações em nível de órgão.

Os animais do grupo CON IM apresentaram infarto com ~ 30% de área de superfície do ventrículo esquerdo ocupada pela cicatriz fibrosa. Esse tamanho de infarto é considerado moderado segundo Pfeffer et al. (1985), sendo capaz de realizar danos à funcionalidade

cardíaca. Outros autores consideram infartos menores que 30% como pequeno (FLETCHER et al., 1981; ANVERSA et al., 1986)

Este trabalho mostrou alterações estruturais estabelecidas pelo IM através do aumento da relação peso dos ventrículos / peso corporal final (PV/PC), que é utilizada como índice hipertrófico, pelo aumento dos DDVE e DSVE e pela redução da ESSIV. As modificações estruturais que o IM provoca no coração estão bem estabelecidas. Essas envolvem a hipertrofia patológica, causada por sobrecarga de volume, com diminuição da espessura da parede ventricular e aumento do diâmetro da câmara ventricular esquerda (NIEMINEN; HEIKKILA, 1976).

Em estudos prévios, ratos que desenvolveram infarto moderado apresentaram aumento no tempo de ejeção, além de diminuição da pressão arterial sistólica e média (PFEFFER et al., 1979). Fletcher et al. (1981) observaram que os animais com IM menor que 30% tiveram menor desenvolvimento de pressão do ventrículo esquerdo e diminuição do volume sistólico, com conseqüente redução do débito cardíaco. Corroborando com esses achados, verificou-se no presente estudo que houve redução da fração de ejeção e da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo dos animais do grupo CON IM, em relação aos do CON SH. Isso ocorre porque após morte celular no coração infartado, há perda de tecido contrátil, hipertrofia compensatória dos cardiomiócitos e fibrose reparativa, contribuindo para a diminuição da complacência cardíaca (SWYNGHEDAUW, 1999).

Inesperadamente, no presente estudo, observou-se diminuição da fração de encurtamento no grupo CON IM, porém a amplitude de contração celular e a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ foram aumentadas neste grupo em relação ao grupo CON SH. Essa discrepância dos resultados pode ser explicada pela análise ecocardiográfica ser realizada no ventrículo esquerdo como um todo e a contratilidade celular e o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ terem sido feitos apenas nas células da área remanescente ao infarto. Pode ser que alterações na matriz extracelular em resposta ao IM tenham diminuindo a complacência do ventrículo esquerdo e, por conseqüência, a fração de encurtamento. Como o processo de isolamento celular digere a matriz extracelular, a mesma não influencia na capacidade contrátil de cardiomiócitos isolados. Esse aumento da amplitude de contração celular e do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, provavelmente, são mecanismos compensatórios para atenuar a sobrecarga provocada pelo infarto.

Alguns estudos prévios observaram a redução na amplitude de contração e/ou amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em animais com IM (HOLT et al., 1998; KIM et al., 2002;

AIT MOU et al., 2009), porém não todos (ANAND et al., 1997; ZHANG et al., 2000; LOENNECHEN et al., 2002). Um trabalho que encontrou aumentos na amplitude de contração de cardiomiócitos de ratos infartados justificou seu achado sugerindo que pudesse haver maior participação dos NCX tanto na contração quanto no relaxamento celular (ZHANG et al., 2000), melhorando a mecânica contrátil dos cardiomiócitos. Todavia, o presente estudo mostrou que não houve diferença na expressão dos NCX nos cardiomiócitos dos animais do grupo CON IM. Segundo Houser; Margulies (2003), as contrações celulares de animais normais e com insuficiência cardíaca podem ser similares quando analisadas em condições basais. Os autores sugerem que a contratilidade dos cardiomiócitos seja realizada sob variações de estímulos inotrópicos (frequência, $[Ca^{2+}]_e$, aumento da pré-carga e catecolaminas).

Os animais infartados do presente estudo apresentaram aumento do tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$, sem alteração no tempo para 50% do relaxamento celular. Esses resultados poderiam ser explicados pela redução do conteúdo das proteínas envolvidas na recaptação de Ca^{2+} (SERCA 2a e FLB) durante o relaxamento, porém os níveis dessas proteínas não foram alterados no presente estudo. Apesar de não ter ocorrido diminuição do conteúdo proteico da SERCA 2a, principal responsável pelo declínio da $[Ca^{2+}]_i$, é possível que a função dessa proteína estivesse diminuída, contribuindo para a redução do conteúdo de Ca^{2+} no RS. Mackiewicz et al.(2009) mostraram que após 3 meses da indução do IM, houve redução da função de SERCA 2a em comparação com animais sham. Esse período de avaliação foi o mesmo utilizado no presente trabalho. Da mesma forma, Zhao et al. (2008) não verificaram diferenças na expressão proteica, porém observaram diminuição da função de SERCA 2a em cardiomiócitos de ratos infartados.

O processo de contração está diretamente relacionado com a entrada de Ca^{2+} no cardiomiócito através dos canais de Ca^{2+} tipo L, e da liberação de Ca^{2+} do RS no citosol através dos RyR2. Assim, no presente estudo o tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ nos animais infartados foi aumentado, contribuindo para a disfunção contrátil. Alterações nas proteínas que regulam o aumento de Ca^{2+} no citosol podem aumentar o tempo para a contração em cardiomiócitos de animais na presença do IM. Sallinen et al. (2007) observaram que o infarto diminuiu a expressão gênica de canais de Ca^{2+} tipo L e do RyR2. Neste sentido, Guo; Chapman; Dhalla (2003) verificaram redução na expressão proteica de RyR2 de ratos infartados.

A contração de cardiomiócitos de animais infartados também pode ser prejudicada pela redução da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} , uma vez que necessitam de maior $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para realizar a mesma força de contração que os animais normais. Fellenius et al.(1985) e Wisloff et al. (2002), mostraram tais modificações em cardiomiócitos, o que atrasou a ativação da contração celular.

Alternativas não farmacológicas para a atenuação ou reversão dos danos ocasionados pelo IM vêm sendo propostas, dentre elas a terapia com células-tronco. Nesta pesquisa, foram utilizadas as CTMs derivadas da medula óssea expandidas em laboratório, que são hipoimunogênicas, pois deixam de expressar HLA classe 2 e moléculas co-estimulatórias, previnem a resposta das células T direta e indiretamente e induzem um microambiente supressivo local através da produção de prostaglandinas e interleucinas. (GNECCHI; DANIELI; CERVIO, 2012).

As CTMs podem ser expandidas e utilizadas de forma autóloga, evitando o problema de encontrar um doador específico (GNECCHI; DANIELI; CERVIO, 2012). Por outro lado, as CTMs transplantadas de forma alogênica não sofrem rejeição, como normalmente acontece em outros tipos celulares. Estudos mostram que não houve rejeição em humanos e animais utilizando o transplante alogênico de CTMs (PITTENGER; MARTIN, 2004; RYAN et al., 2005). Da mesma forma, Aggarwal; Pittenger (2005) demonstraram que o transplante com CTMs alterou fenótipos de células imunes específicas, criando um ambiente “tolerogênico”. Assim, verifica-se que as CTMs podem ser transplantadas de forma alogênica para indivíduos de incompatíveis complexos principal de histocompatibilidade (RYAN et al., 2005). Nota-se, portanto, que tanto o transplante autólogo quanto o alogênico, o qual foi utilizado no presente estudo, são adequados para as CTMs.

No presente estudo, a presença das CTMs marcadas com Qtracker655[®] foi validada 18 horas após aplicação intravenosa. Elas foram identificadas apenas no pulmão e não no local da lesão ou em outros órgãos. Outros autores (GAO et al., 2001; SCHREPFER et al., 2007; ARAUJO, 2013) também observaram que, após infusão por esta via, as células não chegam ao órgão de interesse primário, pois a maioria fica retida no pulmão.

Uma das hipóteses que justificam a retenção destas células nos pulmões trata da relação do tamanho das células e o diâmetro dos capilares pulmonares. Comparações entre diferentes diâmetros celulares e uso de vasodilatadores evidenciaram a retenção ou liberação das células para a corrente arterial (SCHREPFER et al., 2007). A outra hipótese trata da capacidade de adesão das CTMs ao endotélio vascular. Ruster et al. (2006) sugeriram que

existem substâncias ligantes envolvidas na adesão e extravasamento destas células. Esses autores demonstraram que as CTMs interagem com as células do endotélio vascular de maneira coordenada em relação ao fluxo sanguíneo.

Fischer et al. (2009) acreditam num componente mediado por receptor no pulmão, pois, quando administraram um segundo bolus de CTMs, conseguiram capturá-las em maior quantidade em outros órgãos, o que sugere uma saturação destes receptores.

A infusão de CTMs, por via intravenosa, em animais acometidos por IM invocam aumento da densidade capilar, preservação da função cardíaca, redução da taquicardia ventricular, atenuação do afinamento da parede ventricular e diminuição da área infartada (SHAKE et al., 2002; HARE et al., 2009; WOLF et al., 2009; TIMMERS et al., 2011).

A infusão intravenosa de CTMs humanas reduziu o tamanho e produziu melhora funcional no miocárdio infartado de ratos, em parte porque as células, retidas como um embolo no pulmão, regularam a expressão de múltiplos genes, com grande aumento de proteína antiinflamatória TSG-6 (Lee et al. (2009). Essa proteína é de especial interesse devido ao seu conhecido efeito antiinflamatório e porque a resposta inflamatória excessiva contribui para as alterações patológicas após IM (MOSCHAL et al., 2008). Então, os resultados sugerem uma possível explicação para a melhora observada após infusão intravenosa de CTMs. Esses resultados mostram que mesmo as CTMs localizadas apenas no pulmão, podem ser eficientes em induzir respostas benéficas ao coração acometido pelo IM, justificando o menor tamanho do IM (15%) no presente estudo. Apesar de não ter sido encontradas diferenças no diâmetro e na espessura do ventrículo esquerdo após redução do tamanho do infarto em função do tratamento, é possível que tenha ocorrido diminuição da fibrose e da apoptose, além de presença de miogênese e angiogênese, contribuindo com a melhora da fração de ejeção e da fração de encurtamento observada nos animais do grupo CON IM CT (NAGAYA et al., 2004; BERRY et al., 2006; CARVALHO et al., 2006; LI et al., 2011).

Observou-se também, no presente estudo, que as CTMs, isoladamente, foram eficientes em reduzir o tempo para 50% do decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos dos animais infartados, quando comparados com os do grupo CON IM. Além disso, não foram observadas diferenças estatísticas na expressão de proteínas responsáveis pelo relaxamento celular, nem no tempo para 50% do relaxamento dos cardiomiócitos dos ratos do grupo CON IM CT, comparados aos do CON IM, apesar desse último apresentar tendência estatística ($p = 0,059$). Dessa forma, verifica-se que a terapia com CTMs restaurou,

em parte, os danos ao relaxamento celular causados pelo IM. Todavia, esses resultados não excluem a possibilidade de que as CTMs retidas no pulmão possam secretar fatores cardioprotetores em adição a TSG-6. Assim como observado no coração, tem sido observado que as CTMs promovem, no sistema nervoso central, reparação tecidual não somente através da substituição celular, mas por providenciar suporte trófico e imunomodulatório para mecanismos de reparo endógenos (MARTINO; BACIGALUPPI; PERUZZOTTI-JAMETTI, 2011). Também, tem sido postulado que cada célula-tronco possui características únicas e que usam mecanismos distintos de interação com o ambiente e com os mecanismos regenerativos (CHICHA; SMITH; GUZMAN, 2014), e que a terapia combinada pode ser apropriada nas grandes lesões.

As CTMs tem demonstrado um potente suporte trófico (CAPLAN; DENNIS, 2006) com manutenção da integridade tecidual e propriedades imunomodulatórias (WANG, M. et al., 2009), longe do propósito de serem meras produtoras e substituidoras celulares. Então, as CTMs aplicadas via intravenosa, além de aumentar a expressão de fatores de crescimento neurotróficos após a lesão (MAHMOOD; LU; CHOPP, 2004), atuam como células bimodais, providenciando ações imunomodulatórias (CHICHA; SMITH; GUZMAN, 2014). Estudos verificaram que as CTMs são capazes de secretar fatores (TGF- β , PGE 2, IL-10, PD-1, HGF) que inibem a resposta imune mediada pelos linfócitos B e T, assim como pelas células *natural killer*, contribuindo para reduzir a inflamação estabelecida pelo IM (DI NICOLA et al., 2002; VAN DEN AKKER; DE JAGER; SLUIJTER, 2013; VAN DEN AKKER et al., 2013).

Parece que existe um efeito modulatório direto das células-tronco sobre as células imunes residentes no local da lesão e um segundo efeito imunomodulatório sistêmico. Uma de suas ações é segregar células inflamatórias no interior do baço, gerando proteção de longa duração (CHICHA; SMITH; GUZMAN, 2014). Quando avaliados em conjunto, estes achados suportam o conceito de que a resposta imune, local e sistêmica, é um mecanismo de ação potencialmente importante das CTMs.

Como mostrado nas Figuras 10 e 11 do presente estudo, o treinamento físico aeróbio de baixa intensidade conseguiu diminuir o tempo para o pico de contração celular, o tempo para 50% do relaxamento e o tempo para 50% do decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$. O coração exerce a função de bomba, e essa é coordenada pela contração dos cardiomiócitos. Esses respondem ao programa de treinamento físico aumentando o tamanho e a amplitude de contração (KEMI; WISLOFF, 2010). Nesse sentido, no presente estudo, o treinamento de

corrida em esteira promoveu melhoras na contratilidade celular dos animais sham. No entanto, essas não foram capazes de gerarem modificações funcionais no coração *in vivo*.

Os processos de melhora na contração dos cardiomiócitos pelo treinamento físico foram observados em estudos prévios (WISLOFF et al., 2001; NATALI et al., 2002; DIFEE; NAGLE, 2003; CARNEIRO-JUNIOR et al., 2013b; CARNEIRO-JUNIOR et al., 2013a). A redução do tempo para o pico de contração pode estar relacionada à liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (WISLOFF et al., 2001). No que diz respeito ao relaxamento celular, as alterações tanto na contração quanto no transiente de $[Ca^{2+}]_i$, são explicadas pelo aumento do conteúdo proteico de SERCA 2a evidenciados no presente estudo, com consequente melhora na recaptação de Ca^{2+} via RS. Por outro lado, não foi verificado aumento da expressão de FLB, o inibidor endógeno da SERCA 2a.

Indivíduos infartados ou que sofrem de outras complicações que podem levar ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca, tradicionalmente, têm recebido recomendações para evitar o exercício físico, com a crença de que esse poderia agravar a condição cardíaca (WILLENHEIMER et al., 1998). Porém, tem sido verificado que o exercício físico aumenta a capacidade aeróbica e a qualidade de vida desses pacientes (WILLENHEIMER et al., 1998; BELARDINELLI et al., 1999; BENETTI; ARAUJO; SANTOS, 2010; MOHOLDT et al., 2012).

No presente estudo, o treinamento aeróbio de baixa intensidade aumentou a capacidade de exercício nos animais infartados. A melhora da capacidade física está relacionada com adaptações cardiovasculares. Por exemplo, ratos infartados e exercitados aumentaram o VO_{2max} em relação aos controles, com melhora da contratilidade celular cardíaca e dos parâmetros ecocardiográficos (WISLOFF et al., 2002). De fato, o programa de treinamento aplicado no presente estudo conseguiu aumentar a fração de ejeção, fração de encurtamento, DSVE, EPPVEs e a ESSIV atenuando, assim, o remodelamento adverso pós-IM.

A melhora na função cardíaca de animais infartados através do treinamento físico é regulada por diferentes mecanismos, dentre eles a diminuição do conteúdo de colágeno na matriz extracelular, aumento de circulação coronariana e melhora da contratilidade dos cardiomiócitos (DE WAARD et al., 2007; XU et al., 2008b; KEMI; WISLOFF, 2010).

Como esperado, no presente estudo, ocorreu aumento da amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, redução do tempo para o pico de contração e para 50% do relaxamento de cardiomiócitos dos ratos do grupo TR IM, quando comparados aos animais do grupo CON

IM. Esses benefícios em nível celular podem ser explicados pelo aumento do conteúdo proteico de SERCA 2a e fosforilação de FLB_{ser16}.

Assim sendo, no presente estudo, benefícios cardioprotetores parciais causados pelo treinamento aeróbio (ZHANG et al., 2000; KIM et al., 2002; WISLOFF et al., 2002; DE WAARD et al., 2007; AIT MOU et al., 2009) e pelo transplante de células-tronco (MIN et al., 2002; BERRY et al., 2006; LEE et al., 2009; LI et al., 2011; DOS SANTOS et al., 2013) sobre animais com IM.

Em estudo prévio, COSMO et al. (2012) observaram os efeitos da associação das células-tronco transplantadas de forma autóloga com o treinamento físico de natação sobre a função cardíaca de ratos que sofreram IM. Os autores descreveram aumento da fração de ejeção e redução do conteúdo de colágeno nesses animais. Isso foi explicado pela ação parácrina das células-tronco, sugerindo liberação de fatores que contribuíram para a angiogênese, além dos mecanismos de vasodilatação provocados pelo treinamento físico. Todavia, no presente estudo, não foram constatadas alterações significativas nos parâmetros ecocardiográficos pela ação conjunta dos tratamentos.

Porém, esse é o primeiro trabalho a investigar os efeitos do treinamento físico aeróbio em associação com a terapia com CTMs sobre propriedades funcionais e mecânicas de cardiomiócitos isolados do coração de ratos infartados.

Os dados demonstram diminuição no tempo para o pico de contração e aumento na amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em resposta aos tratamentos em conjunto, quando comparado aos cardiomiócitos dos animais infartados tratados com CTMs. Verificou-se também, aumento da expressão de FLB_{ser16}, que pode ter sido causado pela ativação de cascatas que modulam a fosforilação/desfosforilação da FLB, como a via do GMPc que é modulada pelo ON. Outros estudos, no entanto, são necessários para esclarecer esse resultado (SABINE et al., 1995).

Os resultados do presente estudo, em sua maioria, demonstram que alterações celulares e moleculares proporcionadas pelo IM, treinamento físico ou terapia com CTMs levam ao desenvolvimento de adaptações em nível do órgão. Estudos prévios constataam a relação das modificações celulares acarretando melhora, através do treinamento físico e terapia celular, ou piora, ocasionada pelo IM, da função cardíaca (WISLOFF et al., 2002; AIT MOU et al., 2009; LI et al., 2011; DOS SANTOS et al., 2013).

Os resultados do presente estudo fornecem indícios de que os tratamentos utilizados, transplante de CTMs e treinamento físico aeróbio por 12 semanas, iniciado 24 horas após o

IM, podem, isoladamente, produzir adaptações celulares e funcionais no coração acometido pelo IM, que contribuem para a melhora da saúde cardiovascular. No entanto, outras cargas de exercício (intensidade e duração) devem ser testadas. Esses dados sugerem que estes tratamentos podem atenuar o remodelamento cardíaco adverso imposto pelo infarto do miocárdio e prevenir o desenvolvimento de insuficiência cardíaca.

Portanto, a hipótese do presente estudo de que a associação dos dois tratamentos usados, transplante de CTMs e treinamento físico aeróbio por 12 semanas, iniciado 24 horas após o IM, poderia potencializar os efeitos destes sobre parâmetros cardiovasculares e propriedades mecânicas de cardiomiócitos isolados de ratos com IM experimental não foi confirmada. Para a confirmação desta hipótese, os efeitos da associação dos tratamentos observados no grupo TR IM CT deveriam ser superiores, com significância estatística, aos efeitos observados nos dois grupos, COM IM CT e TR IM.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- Em nível do órgão, a associação dos tratamentos, treinamento físico aeróbio iniciado 24 horas após o IM e terapia com CTMs, não foi capaz de alterar os parâmetros cardíacos avaliados, quando comparada com os tratamentos isolados.
- Em nível celular, a associação dos tratamentos aumentou a amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, diminuiu o tempo para o pico de contração e aumentou a expressão de FLB_{ser16} , em relação ao tratamento somente com CTMs. Além disso, diminuiu o tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$, em relação ao tratamento somente com treinamento físico.

7. REFERÊNCIAS

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815-1822, 2005.

AIT MOU, Y., *et al.* Late exercise training improves non-uniformity of transmural myocardial function in rats with ischaemic heart failure. **Cardiovasc Res**, v. 81, n. 3, p. 555-564, 2009.

ANAND, I. S., *et al.* Isolated myocyte contractile function is normal in postinfarct remodeled rat heart with systolic dysfunction. **Circulation**, v. 96, n. 11, p. 3974-3984, 1997.

ANVERSA, P., *et al.* Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth. **Circ Res**, v. 58, n. 1, p. 26-37, 1986.

ARAUJO, M. R. **Avaliação histológica e imunofluorescente da lesão compressiva na medula espinal de ratos Wistar tratados com células-tronco mesenquimais**. 2013. 47 f. - Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

BARBOZA, C. A., *et al.* Impact of exercise training and detraining after myocardial infarction: a literature review. **J. Morphol. Sci.**, v. 29, n. 3, p. 129-134, 2012.

BELARDINELLI, R., *et al.* Randomized, controlled trial of long-term moderate exercise training in chronic heart failure: effects on functional capacity, quality of life, and clinical outcome. **Circulation**, v. 99, n. 9, p. 1173-1182, 1999.

BENETTI, M.; ARAUJO, C. L.; SANTOS, R. Z. Cardiorespiratory fitness and quality of life at different exercise intensities after myocardial infarction. **Arq Bras Cardiol**, v. 95, n. 3, p. 399-404, 2010.

BERRY, M. F., *et al.* Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 290, n. 6, p. H2196-2203, 2006.

BOZI, L. H., *et al.* Exercise training prior to myocardial infarction attenuates cardiac deterioration and cardiomyocyte dysfunction in rats. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 68, n. 4, p. 549-556, 2013.

CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **J Cell Biochem**, v. 98, n. 5, p. 7, 2006.

CARNEIRO-JUNIOR, M. A., *et al.* The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. **J Mol Cell Cardiol**, v. 57, n., p. 119-128, 2013a.

CARNEIRO-JUNIOR, M. A., *et al.* Regional effects of low-intensity endurance training on structural and mechanical properties of rat ventricular myocytes. **J Appl Physiol (1985)**, v. 115, n. 1, p. 107-115, 2013b.

CARNEIRO-JUNIOR, M. A. **Efeitos do treinamento físico e do destreinamento sobre propriedades moleculares e mecânicas de cardiomiócitos isolados de ratos normotensos e hipertensos.** 2013. 104 f. - Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

CARVALHO, K. A., *et al.* Cell transplantation after the coculture of skeletal myoblasts and mesenchymal stem cells in the regeneration of the myocardium scar: an experimental study in rats. **Transplant Proc**, v. 38, n. 5, p. 1596-1602, 2006.

CHEN, C. Y., *et al.* Exercise training improves cardiac function in infarcted rabbits: involvement of autophagic function and fatty acid utilization. **Eur J Heart Fail**, v. 12, n. 4, p. 323-330, 2010.

CHICHA, L.; SMITH, T.; GUZMAN, R. Stem cells for brain repair in neonatal hypoxia-ischemia. **Childs Nerv Syst**, v. 30, n. 1, p. 37-46, 2014.

CLEUTJENS, J. P., *et al.* Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. **Am J Pathol**, v. 147, n. 2, p. 325-338, 1995.

COSMO, S., *et al.* Efeito do exercício associado ao transplante de células-tronco sobre a função ventricular de ratos pós-infarto agudo do miocárdio. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 27, n., p. 9, 2012.

DANIELS, M. C., *et al.* Development of contractile dysfunction in rat heart failure: hierarchy of cellular events. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 293, n. 1, p. R284-292, 2007.

DE WAARD, M. C., *et al.* Early exercise training normalizes myofilament function and attenuates left ventricular pump dysfunction in mice with a large myocardial infarction. **Circ Res**, v. 100, n. 7, p. 1079-1088, 2007.

DI NICOLA, M., *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3838-3843, 2002.

DIFFEE, G. M.; NAGLE, D. F. Regional differences in effects of exercise training on contractile and biochemical properties of rat cardiac myocytes. **J Appl Physiol** (1985), v. 95, n. 1, p. 35-42, 2003.

DOBACZEWSKI, M.; GONZALEZ-QUESADA, C.; FRANGOIANNIS, N. G. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. **J Mol Cell Cardiol**, v. 48, n. 3, p. 504-511, 2010.

DONG, F., *et al.* Critical role for leukocyte hypoxia inducible factor-1alpha expression in post-myocardial infarction left ventricular remodeling. **Circ Res**, v. 106, n. 3, p. 601-610, 2010.

DOS SANTOS, L., *et al.* Cell therapy prevents structural, functional and molecular remodeling of remote non-infarcted myocardium. **Int J Cardiol**, v. 168, n. 4, p. 3829-3836, 2013.

ERLEBACHER, J. A., *et al.* Early dilation of the infarcted segment in acute transmural myocardial infarction: role of infarct expansion in acute left ventricular enlargement. **J Am Coll Cardiol**, v. 4, n. 2, p. 201-208, 1984.

FELLENIUS, E., *et al.* Chronic infarction decreases maximum cardiac work and sensitivity of heart to extracellular calcium. **Am J Physiol**, v. 249, n. 1 Pt 2, p. H80-87, 1985.

FISCHER, U. M., *et al.* Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. **Stem Cells Dev**, v. 18, n. 5, p. 683-692, 2009.

FLETCHER, P. J., *et al.* Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. Effects on systolic function. **Circ Res**, v. 49, n. 3, p. 618-626, 1981.

FRANCIS, G. S. Pathophysiology of chronic heart failure. **Am J Med**, v. 110 Suppl 7A, n., p. 37S-46S, 2001.

GAO, J., *et al.* The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. **Cells Tissues Organs**, v. 169, n. 1, p. 12-20, 2001.

GNECCHI, M.; DANIELI, P.; CERVIO, E. Mesenchymal stem cell therapy for heart disease. **Vascul Pharmacol**, v. 57, n. 1, p. 48-55, 2012.

GUO, X.; CHAPMAN, D.; DHALLA, N. S. Partial prevention of changes in SR gene expression in congestive heart failure due to myocardial infarction by enalapril or losartan. **Mol Cell Biochem**, v. 254, n. 1-2, p. 163-172, 2003.

GUPTA, S.; PRAHASH, A. J.; ANAND, I. S. Myocyte contractile function is intact in the post-infarct remodeled rat heart despite molecular alterations. **Cardiovasc Res**, v. 48, n. 1, p. 77-88, 2000.

HAMILTON, K. L., *et al.* Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 281, n. 3, p. H1346-1352, 2001.

HARE, J. M., *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol**, v. 54, n. 24, p. 2277-2286, 2009.

HASHIMOTO, N. Y., *et al.* Determinantes Moleculares da Hipertrofia Cardíaca Induzida por Diferentes Volumes de Treinamento Aeróbio. **Rev Bras Cardiol**, v. 24, n. 3, p. 9, 2011.

HOLT, E., *et al.* Mechanisms of cardiomyocyte dysfunction in heart failure following myocardial infarction in rats. **J Mol Cell Cardiol**, v. 30, n. 8, p. 1581-1593, 1998.

HOUSER, S. R.; MARGULIES, K. B. Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure? **Circ Res**, v. 92, n. 4, p. 350-358, 2003.

JAMEEL, M. N.; ZHANG, J. Stem cell therapy for ischemic heart disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 13, n. 12, p. 1879-1897, 2010.

KEMI, O. J., *et al.* Exercise training restores aerobic capacity and energy transfer systems in heart failure treated with losartan. **Cardiovasc Res**, v. 76, n. 1, p. 91-99, 2007.

KEMI, O. J.; WISLOFF, U. Mechanisms of exercise-induced improvements in the contractile apparatus of the mammalian myocardium. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 199, n. 4, p. 425-439, 2010.

KHOKHLOVA, O. N., *et al.* Improvement of cardiac contractile function in rats with postinfarction cardiosclerosis after transplantation of mononuclear and multipotent stroma bone marrow cells. **Bull Exp Biol Med**, v. 153, n. 4, p. 545-549, 2012.

KIM, Y. K., *et al.* Altered excitation-contraction coupling in myocytes from remodeled myocardium after chronic myocardial infarction. **J Mol Cell Cardiol**, v. 34, n. 1, p. 63-73, 2002.

KONG, X., *et al.* Sarcolemmal and mitochondrial K(atp)channels mediate cardioprotection in chronically hypoxic hearts. **J Mol Cell Cardiol**, v. 33, n. 5, p. 1041-1045, 2001.

LEE, R. H., *et al.* Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. **Cell Stem Cell**, v. 5, n. 1, p. 54-63, 2009.

LI, Y., *et al.* Dual-modal tracking of transplanted mesenchymal stem cells after myocardial infarction. **Int J Nanomedicine**, v. 6, n., p. 815-823, 2011.

LOENNECHEN, J. P., *et al.* Cardiomyocyte contractility and calcium handling partially recover after early deterioration during post-infarction failure in rat. **Acta Physiol Scand**, v. 176, n. 1, p. 17-26, 2002.

LUNDE, K., *et al.* Exercise capacity and quality of life after intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction: results from the Autologous Stem cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction (ASTAMI) randomized controlled trial. **Am Heart J**, v. 154, n. 4, p. 710 e711-718, 2007.

MACKIEWICZ, U., *et al.* Sarcolemmal Ca²⁺-ATPase ability to transport Ca²⁺ gradually diminishes after myocardial infarction in the rat. **Cardiovasc Res**, v. 81, n. 3, p. 546-554, 2009.

MAGALHÃES, F. C., *et al.* Hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento físico: eventos moleculares e celulares que modificam o fenótipo. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**, v. 7, n. 1, p. 4, 2008.

MAHMOOD, A.; LU, D.; CHOPP, M. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. **J Neurotrauma**, v. 21, n. 1, p. 33-39, 2004.

MARTINO, G.; BACIGALUPPI, M.; PERUZZOTTI-JAMETTI, L. Therapeutic stem cell plasticity orchestrates tissue plasticity. **Brain**, v. 134, n. Pt 6, p. 1585-1587, 2011.

MCPHEE, J. S.; GANONG, W. F. **Fisiopatologia da Doença: Uma introdução à medicina clínica**. Porto Alegre: AMGH, 2011

MENDES, O. C., *et al.* Tolerância ao Esforço em Ratos com Estenose Aórtica e Disfunção Ventricular Diastólica e/ou Sistólica. **Arq Bras Cardiol**, v. 100, n. 1, p. 7, 2012.

MILL, J. G., *et al.* Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. **Cardiovasc Res**, v. 24, n. 9, p. 748-753, 1990.

MILL, J. G., *et al.* Ativação da Enzima Conversora de Angiotensina no Coração após Infarto do Miocárdio e suas Repercussões no Remodelamento Ventricular. **Arq Bras Cardiol**, v. 69, n. 2, p. 10, 1997.

MILL, J. G., *et al.* Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression for heart failure. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 9, p. 890-898, 2011.

MIN, J. Y., *et al.* Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. **J Appl Physiol (1985)**, v. 92, n. 1, p. 288-296, 2002.

MOHOLDT, T., *et al.* Aerobic interval training increases peak oxygen uptake more than usual care exercise training in myocardial infarction patients: a randomized controlled study. **Clin Rehabil**, v. 26, n. 1, p. 33-44, 2012.

MORK, H. K., *et al.* Increased cardiomyocyte function and Ca²⁺ transients in mice during early congestive heart failure. **J Mol Cell Cardiol**, v. 43, n. 2, p. 177-186, 2007.

MULDER, P., *et al.* Long-term survival and hemodynamics after endothelin-a receptor antagonism and angiotensin-converting enzyme inhibition in rats with chronic heart failure: monotherapy versus combination therapy. **Circulation**, v. 106, n. 9, p. 1159-1164, 2002.

NAGAYA, N., *et al.* Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 287, n. 6, p. H2670-2676, 2004.

NATALI, A. J., *et al.* Regional effects of voluntary exercise on cell size and contraction-frequency responses in rat cardiac myocytes. **J Exp Biol**, v. 204, n. Pt 6, p. 1191-1199, 2001.

NATALI, A. J., *et al.* Different regional effects of voluntary exercise on the mechanical and electrical properties of rat ventricular myocytes. **J Physiol**, v. 541, n. Pt 3, p. 863-875, 2002.

NIEMINEN, M.; HEIKKILA, J. Echoventriculography in acute myocardial infarction. II: Monitoring of left ventricular performance. **Br Heart J**, v. 38, n. 3, p. 271-281, 1976.

ORENSTEIN, T. L., *et al.* Favorable left ventricular remodeling following large myocardial infarction by exercise training. Effect on ventricular morphology and gene expression. **J Clin Invest**, v. 96, n. 2, p. 858-866, 1995.

ORLIC, D., *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, v. 410, n. 6829, p. 701-705, 2001.

PFEFFER, M. A., *et al.* Myocardial infarct size and ventricular function in rats. **Circ Res**, v. 44, n. 4, p. 503-512, 1979.

PFEFFER, M. A., *et al.* Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. **Circulation**, v. 72, n. 2, p. 406-412, 1985.

PINA, I. L., *et al.* Exercise and heart failure: A statement from the American Heart Association Committee on exercise, rehabilitation, and prevention. **Circulation**, v. 107, n. 8, p. 1210-1225, 2003.

PITTENGER, M. F.; MARTIN, B. J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. **Circ Res**, v. 95, n. 1, p. 9-20, 2004.

POWERS, S. K.; QUINDRY, J. C.; KAVAZIS, A. N. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 2, p. 193-201, 2008.

RESPRESS, J. L., *et al.* Role of RyR2 phosphorylation at S2814 during heart failure progression. **Circ Res**, v. 110, n. 11, p. 1474-1483, 2012.

ROMAN-CAMPOS, D., *et al.* Changes in cellular contractility and cytokines profile during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Basic Res Cardiol**, v. 104, n. 3, p. 238-246, 2009.

RUSTER, B., *et al.* Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. **Blood**, v. 108, n. 12, p. 3938-3944, 2006.

RYAN, J. M., *et al.* Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. **J Inflamm (Lond)**, v. 2, n., p. 8, 2005.

SABINE, B., *et al.* Cyclic GMP-mediated phospholamban phosphorylation in intact cardiomyocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 214, n. 1, p. 75-80, 1995.

SAHN, D. J., *et al.* Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. **Circulation**, v. 58, n. 6, p. 1072-1083, 1978.

SALLINEN, P., *et al.* Time course of changes in the expression of DHPR, RyR(2), and SERCA2 after myocardial infarction in the rat left ventricle. **Mol Cell Biochem**, v. 303, n. 1-2, p. 97-103, 2007.

SCHEUER, J.; TIPTON, C. M. Cardiovascular adaptations to physical training. **Annu Rev Physiol**, v. 39, n., p. 221-251, 1977.

SCHREPFER, S., *et al.* Stem cell transplantation: the lung barrier. **Transplant Proc**, v. 39, n. 2, p. 573-576, 2007.

SHAH, V. K.; SHALIA, K. K. Stem Cell Therapy in Acute Myocardial Infarction: A Pot of Gold or Pandora's Box. **Stem Cells Int**, v. 2011, n., p. 536758, 2011.

SHAKE, J. G., *et al.* Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. **Ann Thorac Surg**, v. 73, n. 6, p. 1919-1925; discussion 1926, 2002.

SIPIDO, K. R., *et al.* Altered Na/Ca exchange activity in cardiac hypertrophy and heart failure: a new target for therapy? **Cardiovasc Res**, v. 53, n. 4, p. 782-805, 2002.

SONG, J., *et al.* Sprint training improves contractility in postinfarction rat myocytes: role of Na⁺/Ca²⁺ exchange. **J Appl Physiol (1985)**, v. 97, n. 2, p. 484-490, 2004.

STRABURZYNSKA-MIGAJ, E., *et al.* Exercise capacity, arrhythmic risk profile, and pulmonary function is not influenced by intracoronary injection of bone marrow stem cells in patients with acute myocardial infarction. **Int J Cardiol**, v. 159, n. 2, p. 134-138, 2012.

SULLIVAN, M. J., *et al.* Relation between central and peripheral hemodynamics during exercise in patients with chronic heart failure. Muscle blood flow is reduced with maintenance of arterial perfusion pressure. **Circulation**, v. 80, n. 4, p. 769-781, 1989.

SWYNGHEDAUW, B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. **Physiol Rev**, v. 79, n. 1, p. 215-262, 1999.

TIMMERS, L., *et al.* Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. **Stem Cell Res**, v. 6, n. 3, p. 206-214, 2011.

VAN DEN AKKER, F.; DE JAGER, S. C.; SLUIJTER, J. P. Mesenchymal stem cell therapy for cardiac inflammation: immunomodulatory properties and the influence of toll-like receptors. **Mediators Inflamm**, v. 2013, n., p. 181020, 2013.

VAN DEN AKKER, F., *et al.* Cardiac stem cell therapy to modulate inflammation upon myocardial infarction. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 2, p. 2449-2458, 2013.

VAN NIEUWENHOVEN, F. A.; TURNER, N. A. The role of cardiac fibroblasts in the transition from inflammation to fibrosis following myocardial infarction. **Vascul Pharmacol**, v. 58, n. 3, p. 182-188, 2013.

VILQUIN, J. T.; MAROLLEAU, J. P.; SCHWARTZ, K. Cell transplantation for the treatment of heart failure. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 2, n. 3, p. 8, 2005.

WANG, M., *et al.* The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. **Immunology**, v. 126, n. 2, p. 220-232, 2009.

WANG, T., *et al.* Effects of bone marrow mesenchymal stem cells in a rat model of myocardial infarction. **Resuscitation**, v. 83, n. 11, p. 1391-1396, 2012.

WARING, C. D., *et al.* The adult heart responds to increased workload with physiologic hypertrophy, cardiac stem cell activation, and new myocyte formation. **Eur Heart J**, v., n., p., 2012.

WHITE, H. D.; CHEW, D. P. Acute myocardial infarction. **Lancet**, v. 372, n. 9638, p. 570-584, 2008.

WILLENHEIMER, R., *et al.* Exercise training in heart failure improves quality of life and exercise capacity. **Eur Heart J**, v. 19, n. 5, p. 774-781, 1998.

WISLOFF, U., *et al.* Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. **Cardiovasc Res**, v. 50, n. 3, p. 495-508, 2001.

WISLOFF, U., *et al.* Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. **Cardiovasc Res**, v. 54, n. 1, p. 162-174, 2002.

WOLF, D., *et al.* Dose-dependent effects of intravenous allogeneic mesenchymal stem cells in the infarcted porcine heart. **Stem Cells Dev**, v. 18, n. 2, p. 321-329, 2009.

XU, X., *et al.* Effects of exercise training on cardiac function and myocardial remodeling in post myocardial infarction rats. **J Mol Cell Cardiol**, v. 44, n. 1, p. 114-122, 2008a.

XU, X., *et al.* Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade limits post-infarct ventricular remodelling in rats. **Cardiovasc Res**, v. 78, n. 3, p. 523-532, 2008b.

YOSHIYAMA, M., *et al.* Differences in expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and Na⁺-Ca²⁺ exchanger genes between adjacent and remote noninfarcted myocardium after myocardial infarction. **J Mol Cell Cardiol**, v. 29, n. 1, p. 255-264, 1997.

ZHANG, L. Q., *et al.* Sprint training restores normal contractility in postinfarction rat myocytes. **J Appl Physiol (1985)**, v. 89, n. 3, p. 1099-1105, 2000.

ZHAO, X. Y., *et al.* rAAV-asPLB transfer attenuates abnormal sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity and cardiac dysfunction in rats with myocardial infarction. **Eur J Heart Fail**, v. 10, n. 1, p. 47-54, 2008.

ZUK, P. A., *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol Biol Cell**, v. 13, n. 12, p. 4279-4295, 2002.

8. ANEXOS

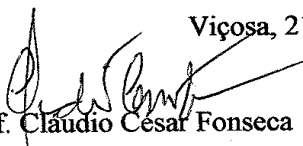
CERTIFICADO

A Comissão de Ética para Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo n.º 05/2013, intitulado “*Efeitos do exercício físico regular associado á terapia com células tronco sobre parâmetros funcionais e celulares do miocárdio de ratos submetidos ao infarto do miocárdio experimental*”, coordenado pelo professor Antônio José Natali, do Departamento de Educação Física está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em 21/02/2013, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 05/2013, named “Effects of regular physical training associated with stem cell therapy on functional and cellular parameters of myocardial of rats subjected to experimental myocardial infarction” is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian Society of Science in Laboratory Animals (SBCAL) and with actual Brazilian legislation. This Institutional Commission on February, 21, 2013 approved this process. This certificate expire in 12 months.

Viçosa, 21 de fevereiro de 2013


Prof. Cláudio César Fonseca
Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV