

FELIPE GOMES BELFORT

**INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO ASSOCIADO À
TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA MORFOLOGIA E
FUNÇÃO DO VENTRÍCULO DIREITO DE RATOS COM INFARTO
INDUZIDO NO VENTRÍCULO ESQUERDO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

B428i
2014

Belfort, Felipe Gomes, 1986-
Influência do treinamento físico aeróbio associado à terapia com células-tronco mesenquimais na morfologia e função do ventrículo direito de ratos com infarto induzido no ventrículo esquerdo / Felipe Gomes Belfort. – Viçosa, MG, 2014.
xviii, 95f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Antônio José Natali.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 76-95.

1. Exercícios físicos. 2. Células-tronco. 3. Infarto do Miocárdio. 4. Coração - Ventrículos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Educação Física. Programa de Pós-graduação em Educação Física. II. Título.

CDD 22. ed. 613.71

FELIPE GOMES BELFORT

**INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO ASSOCIADO À
TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA MORFOLOGIA E
FUNÇÃO DO VENTRÍCULO DIREITO DE RATOS COM INFARTO
INDUZIDO NO VENTRÍCULO ESQUERDO**

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

APROVADA: 30 de maio de 2014.

Wellington Lunz

Miguel Araújo Carneiro-Júnior

Ricardo Junqueira Del Carlo
(Coorientador)

Daise Nunes Queiroz da Cunha
(Coorientadora)

Antônio José Natali
(Orientador)

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

Á Deus pela saúde, fé e força a mim concedido durante toda a minha vida e, em especial, na parte final de conclusão desse trabalho.

Aos meus "super" pais José e Graça pelo amor, carinho, investimento, paciência, pelo exemplo de superação, pela fé, pelas orações e por muitas vezes, ter aberto mão dos seus sonhos em prol dos meus.

Á minha querida irmã Anne pela cumplicidade, amor e amizade. Á minha irmã do coração, Laurinha, pelo amor e respeito. À minha irmã Ana Paula e meu cunhado Davidsom pelo carinho, pelo amor, pelos sempre valiosos conselhos, mas, principalmente, por terem gerado as minhas sobrinhas Sara e Rebeca, cujo o amor verdadeiro e risadas, por muitas vezes, renovaram o meu ânimo nessa árdua caminhada.

Ao meu já idoso cachorro, Pitty, que mesmo sem falar me ensinou algumas lições sobre lealdade e afeto.

Às famílias Gomes e Belfort pelo o apoio e carinho, mesmo sem entender nada com o que eu trabalhava: obrigado Tias por oraram e vibrarem a cada conquista. Ao tio Vino (in memorian) pelo carinho e por me ensinar a dar valor as pequenas coisas da vida.

À toda família Pio, em especial ao Camillo e Winkler, pelo incentivo, risadas e fidelidade nesses 22 anos de amizade.

Aos meninos do G8: Osmar, João, Rô, Gê, Lika, Carlão e Cassia, que seja nos casuais encontros devido à distância ou via internet me incentivaram em momentos cruciais me mantendo firme para a conclusão desse processo. Amor incondicional por vocês.

Aos grandes amigos de Viçosa que contribuíram e muito nessa caminhada: Lucas Calouro, Túlio, William, Márcio Toddy, Elise "Tamisa", Natália, Priscila Niquini, Douglas e aos moradores da república Casa da Tia por todo apoio e descontração. Agradeço também a todos da EFI07 que ainda me divertem e contribuem para o meu crescimento pessoal e profissional

Dedico essa conquista também aos meus grandes amigos de BH: Thales, Amendoim, Cabelinho, Dioguito e Marcelinho pela amizade verdadeira e por

compreenderem a distância. Aos meus grandes amigos de infância Anderson, Carioca e Rominho por serem tão leais a nossa amizade mesmo com a minha ausência.

À minha querida amiga Juliana Silveira pela amizade, almoços no RU, risadas e bons momentos que a sua companhia proporciona.

Ao já mestre Victor Neiva Lavorato pela companhia e auxílio durante toda a fase experimental.

À imprescindível ajuda de toda equipe que auxiliou nesse projeto: Bárbara Okano, Vanessa Guedes, Betânia Monteiro, Luís Silame (Peixe), Filipe Rios, Lucas Rios, Matheus “pinquinha”, Thamires, Anselmo, Aurora, Joel, Helder e Débora.

À professora Edilamar Menezes de Oliveira por ter aberto o laboratório de Educação Física da USP e da técnica de laboratório Glória Mota pelo exímio trabalho e auxílio na análise de algumas amostras.

Ao professor e orientador Antônio José Natali, pela oportunidade, orientação, grande paciência, pelo exemplo de honestidade, integridade e pelos ensinamentos durante todos esses anos.

Ao professor e Co-orientador Thales Nicolau Prímola Gomes pela oportunidade e sugestões para a composição deste trabalho.

A Co-orientadora Daise Nunes Queiroz da Cunha pela paciência, ensinamentos durante toda a jornada de experimentos e por abrir mão, muitas vezes, de ficar com a sua família para a concretização desse trabalho.

Ao professor e Co-orientador Ricardo Junqueira Del’Carlo pela paciência e disposição em resolver os problemas que ocorreram na ausência do professor Natali.

Ao professor Wellington Lunz pela honrosa participação em meu seminário de defesa de dissertação.

Aos amigos do BIOEX: Judson, Miguel, Gilton, Marcinha, Regiane, Helton, Carolina Paiva, Bárbara Braga, Cláudia e tantos outros que por ali passaram e que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Educação Física: Maísa, Luís e Jackson, por sempre estarem dispostos a ajudar e pela convivência.

Aos animais, que com o seu sacrifício, contribuíram com o avanço da ciência.

À CAPES, FAPEMIG e CNPQ pelo fundamental auxílio financeiro.

BIOGRAFIA

Felipe Gomes Belfort, filho de Maria da Pena Gomes Belfort e José Cândido Belfort Neto, nasceu em Belo Horizonte, no estado de Minas Gerias, no dia 09 de julho de 1986.

Em março de 2007 ingressou no curso de Educação Física pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, o qual foi concluído em Julho de 2011. Em março de 2012 iniciou o mestrado em Educação Física no programa de pós-graduação da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se a defesa em maio de 2014.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Acoplamento excitação contração no miocárdio.....	1
1.2 Infarto agudo do miocárdio.....	3
1.3 Remodelamento cardíaco após infarto agudo do miocárdio.....	5
1.4 Terapia com células-tronco e infarto agudo do miocárdio.....	12
1.5 Efeitos do exercício físico após infarto agudo do miocárdio.....	11
1.5.1 Efeitos do exercício físico no VE após infarto agudo do miocárdio.....	12
1.5.2 Efeitos do exercício físico no VD após infarto agudo do miocárdio no VE.....	15
1.5.3 Efeitos do exercício físico associado à terapia com CTs após infarto do miocárdio.....	17
2 OBJETIVO.....	20
2.1 Objetivos específicos.....	18
3 HIPÓTESE.....	21
4 METODOLOGIA.....	22
4.1 Animais e desenho experimental.....	22
4.2 Indução do infarto.....	23
4.2.1 Anestesia	23
4.2.2 Esternotomia e infarto do miocárdio.....	24
4.2.3 Cuidados pós-operatórios.....	25
4.3 Cultivo das CTMs, marcação com QTRACKER e infusão.....	25
4.3.1 Coleta e cultivo das CTMs.....	26
4.3.2 Caracterização das CTMs.....	26
4.3.3 Marcação e transplante das CTMs.....	29
4.4 Protocolo de treinamento físico.....	30

4.4.1 Adaptação à esteira.....	30
4.4.2 Exercício após o infarto agudo do miocárdio.....	30
4.4.3 Avaliação da tolerância ao esforço físico.....	31
4.4.4 Programa de treinamento físico	31
4.5 Avaliação por ECO-Dopplercardiografia (ECO).....	33
4.5.1 Anestesia.....	33
4.5.2 ECO-Doppler cardiografia.....	33
4.6 Peso do coração e dos ventrículos.....	34
4.7 Avaliação histológica para a medida do tamanho do infarto.....	34
4.8 Conteúdo de água nos pulmões.....	35
4.9 Contratilidade celular.....	36
4.9.1 Isolamento dos cardiomiócitos.....	36
4.9.2 Soluções de isolamento.....	37
4.9.3 Solução tampão hepes	37
4.9.4 Mensuração da contração.....	38
4.10 Medida e análise do transiente de $[Ca^{2+}]_i$	40
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
6 RESULTADOS.....	45
6.1 Eficiência do Treinamento.....	45
6.2 Peso corporal, pesos absolutos e relativos do coração e ventrículos, tamanho do infarto e conteúdo de água dos pulmões.....	47
6.3 Ecocardiografia.....	52
6.4 Morfologia dos cardiomiócitos.....	54
6.5 Contratilidade dos cardiomiócitos do VD.....	56
6.6 Transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em cardiomiócitos do VD.....	59
7 DISCUSSÃO.....	63
7.1 Protocolo de treinamento físico adotado.....	63
7.2 Peso corporal, pesos relativos e absolutos do coração e ventrículos, tamanho do infarto e conteúdo de água dos pulmões.....	64
7.3 Morfologia do VD e dos cardiomiócitos isolados.....	67
7.4 Função do VD e dos cardiomiócitos isolados.....	68

7.4.1 Função do VD.....	69
7.5 Propriedades Mecânicas dos cardiomiócitos isolados.....	70
7.5.1 Efeitos do infarto agudo do miocárdio.....	70
7.5.2 Efeitos do protocolo de exercício.....	71
7.5.3 Efeitos da terapia com CTMs.....	72
7.5.4 Efeitos da associação do exercício e a terapia com CTMs.....	73
8 CONCLUSÃO.....	75
9 REFERÊNCIAS.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca²⁺]: Concentração de cálcio

[Ca²⁺]_i: Concentração intracelular de cálcio

ACADE: Artéria coronária descendente anterior esquerda;

AEC: Acoplamento excitação-contração

AT1: Receptor de angiotensina II tipo 1;

AngII: Angiotensina II;

Ca²⁺: Cálcio;

CaKMII: Cálcio calmodulina quinase II;

CTMs: Células-tronco Mesenquimais;

CTs: Células-tronco;

DC: Débito Cardíaco;

DDVE: Diâmetro diastólico no ventrículo esquerdo;

DHPR: Receptores de dihidropiridina;

DSVE: Diâmetro sistólico no ventrículo esquerdo;

dP/dt_{max}: Taxa Máxima de Elevação de Pressão;

dP/dt_{min}: Taxa Máxima de Queda de Pressão;

ECG: Eletrocardiograma;

ECO: Eco-Dopplercardiografia

ESSIV: Espessura do septo interventricular;

EX SHAM: Grupo de animais exercitados que foram submetidos à cirurgia simulada;

EX IM: Grupo de animais exercitados que foram submetidos ao infarto do miocárdio;

EX IM CT: Grupo de animais exercitados e infartados que foram submetidos à terapia com CTMs;

FC: Frequência cardíaca;

FE: Fração de Ejeção;

HAS: Hipertensão arterial sistêmica;

IM: Infarto do miocárdio;

mAKAP: Proteína Quinase A de ancoragem;

MMPs: Metaloproteinases da matriz extracelular;

ME: Matriz extracelular;

MHC: Miosina de cadeia pesada;
NCX: Trocador sódio-cálcio;
O₂: Oxigênio;
PA: Potencial de ação;
PAH: Hipertensão arterial pulmonar;
PDFVE: Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo;
PKA: Proteína Quinase A;
PKC: Proteína Quinase C;
PLB: Fosfolamban;
PLB_{ser16}: Fosfolamban fosforilada na Serina 16;
PLB: Fosfolamban total;
PP1: Proteína fosfatase 1;
PP2A: proteína fosfatase 2^a;
PSVE: Pressão Sistólica no Ventrículo Esquerdo;
RyR₂ : Receptores de Rianodina
ROS: Espécies reativas de oxigênio;
RS: Retículo Sarcoplasmático;
RVEF: Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo;
RVMPI: Índice de Performance do Ventrículo Direito;
SED SHAM: Grupo de animais sedentários que foram submetidos à cirurgia simulada;
SED IM: Grupo de animais sedentários que foram submetidos ao infarto do miocárdio;
SED IM CT: Grupo de animais sedentários e infartados que foram submetidos à terapia com CTMs
Ser-16: Serina 16;
SERCA2a: Ca²⁺ Atp_{ase} do retículo sarcoplasmático;
SIV: Septo Interventricular;
SNS: Sistema Nervoso Simpático;
SRAA: Sistema Renina Angiotensina Aldosterona;
TAPSE: Excursão Sistólica Através do Plano Anular da Tricúspide;
Thr-17: Treonina 17;
TIMPs: Inibidores teciduais de metaloproteinases da matriz;
TNF α : Fator de necrose tumoral;

TTF: Teste do Tempo total de exercício até a fadiga;

VE: Ventrículo esquerdo;

VD: Ventrículo direito;

VEGF: Fator de Crescimento do Endotélio Vascular;

VMC: Velocidade máxima de corrida.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Figura representativa do desenho experimental do presente estudo.....	23
Figura 2: Avaliação da frequência de CD 34, CD 45, CD 90 e CD 54 por citometria de fluxo em células tronco mesenquimais oriundas da medula óssea de ratos Wistar.....	28
Figura 3: Representação do programa utilizado para aquisição das imagens e dos registros das contrações dos cardiomiócitos isolados.....	39
Figura 4: Traçado representativo de uma contração celular.....	40
Figura 5: Cardiomiócito isolado incubado com o indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo-4 AM).....	42
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.....	43
Figura 7: (A) Teste do tempo total de exercício até a fadiga dos animais experimentais após o período de treinamento de corrida aeróbico (minutos) de 13 – 15 animais por grupo; (B) Frequência cardíaca de repouso (batimentos por minuto).....	45
Figura 8: (A) Amplitude de contração dos cardiomiócitos (% do comprimento celular de repouso - % c.c.r); (B) Tempo para o pico de contração (milisegundos - ms); (C) Tempo para 50% do relaxamento (milisegundos - ms).....	56
Figura 9: (A) Amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ ($F_{máx}/F_0$); (B) Tempo para o pico do transiente $[Ca^{2+}]_i$ (milisegundos - ms); (C) Tempo para 50% do decaimento do $[Ca^{2+}]_i$ (milisegundos - ms).....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Protocolo de treinamento.....	32
Tabela 2: Peso corporal inicial e final, peso do coração, peso dos ventrículos, peso do ventrículo direito, seus respectivos pesos relativos, tamanho do infarto e conteúdo de água dos pulmões.....	50
Tabela 3: Dados ecocardiográficos referentes ao ventrículo direito.....	53
Tabela 4: Morfologia dos cardiomiócitos do ventrículo direito.....	55

RESUMO

BELFORT, Felipe Gomes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2014. **Influência do treinamento físico aeróbio associado à terapia com células-tronco mesenquimais na morfologia e função do ventrículo direito de ratos com infarto do miocárdio induzido no ventrículo esquerdo.** Orientador: Antônio José Natali. Co-orientadores: Thales Nicolau Prímola Gomes, Ricardo Junqueira Del'Carlo e Daise Nunes Queiroz da Cunha.

O objetivo do presente estudo foi verificar a influência do treinamento físico aeróbio associado à terapia com células-tronco mesenquimais (CTMs) na morfologia e função do ventrículo direito (VD) de ratos com infarto (IM) induzido no ventrículo esquerdo (VE). Foram utilizados 96 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, com cerca de 30 dias de idade e peso corporal de $146 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$. Os animais foram separados em grupos experimentais com 16 ratos cada: sedentário cirurgia simulada (SED SHAM), sedentário infartado (SED IM), sedentário infartado e tratado com células-tronco mesenquimais (SED IM CT), exercitado cirurgia simulada (EX SHAM); exercitado infartado (EX IM) e exercitado infartado e tratado com células-tronco mesenquimais (EX IM CT). No início e ao final do período de treinamento, todos os animais foram submetidos a um teste de esforço progressivo para determinar o tempo total de exercício até a fadiga (TTF). A velocidade máxima de corrida (VMC) obtida neste teste no início do período foi utilizada para determinar a intensidade de corrida adotada no programa de treinamento. Vinte e quatro horas após a indução do IM no VE e infusão das CTMs ou após realização da cirurgia simulada, os animais dos grupos exercitados iniciaram o programa de treinamento de corrida com carga progressiva em esteira rolante (velocidade final: 60 % da VMC, 60min/dia, 0° de inclinação, 5 dias/semana) que durou 12 semanas. Os animais dos grupos sedentários permaneceram pelo mesmo período em suas caixas. Ao final do período experimento, 8 animais de cada grupo foram utilizados para análises histológicas e ecocardiográficas (ECO) da função do VD. Os cardiomiócitos do VD dos demais animais de cada grupo foram isolados por dispersão enzimática e foram utilizados para análises morfológicas e mensuração da contratilidade e do transiente intracelular global de cálcio $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (frequência de estimulação de 1Hz

em temperatura ambiente de ~ 25°C). Os resultados mostraram que os animais treinados apresentaram maior TTF ao final do período de treinamento, comparados aos sedentários ($p \leq 0,05$). O IM ocasionou um acometimento de 30,40% do miocárdio, aumentou o peso do coração, pesos absoluto e relativo dos ventrículos ($p \leq 0,05$). Não foi detectado nenhum efeito do IM sobre os pesos absoluto e relativo do VD. O IM reduziu ($p < 0,05$) a função do VD (TAPSE: SED IM = $0,54 \pm 0,16\text{cm}$ vs SED SHAM = $1,40 \pm 0,21\text{cm}$). Não foram detectados efeitos do IM sobre as propriedades morfológicas estruturais do VD e sobre a morfologia celular ($p > 0,05$). O IM aumentou a amplitude de contração celular e do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e reduziu os tempos para o pico e para 50% do decaimento do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($p \leq 0,05$). A terapia celular reduziu no percentual de área infartada (15 %) e atenuou a redução da função do VD (TAPSE: SED IM CT = $1,28 \pm 0,17\text{cm}$ vs SED IM = $0,54 \pm 0,16\text{cm}$) ($p \leq 0,05$). Todavia, a terapia celular não teve efeitos ($p > 0,05$) sobre o peso do coração, pesos absoluto e relativo dos ventrículos, pesos absoluto e relativo do VD, propriedades morfológicas estruturais do VD e morfologia dos cardiomiócitos (comprimento, largura e volume). A terapia celular reduziu ($p < 0,05$) a amplitude e o tempo para o pico de contração celular, a amplitude do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e aumentou ($p < 0,05$) tanto o tempo para o pico como o tempo para 50% de decaimento do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. O treinamento físico reduziu a área infartada (21,33%), mas não causou efeitos no peso do coração, pesos absoluto e relativo dos ventrículos e pesos absoluto e relativo do VD. Foi observado aumento da função do VD em resposta ao treinamento físico (TAPSE: EX IM = $1,47 \pm 0,17\text{cm}$ vs SED IM = $0,54 \pm 0,16\text{cm}$), porém não foram verificados efeitos sobre as propriedades morfológicas estruturais do VD e sobre a morfologia dos cardiomiócitos ($p > 0,05$). Na contratilidade celular, o treinamento físico reduziu a amplitude de contração e o tempo para 50% do relaxamento celular ($p \leq 0,05$). Em relação ao transiente, o treinamento aumentou o tempo para o pico do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($p < 0,05$). A associação das terapias (EX + CTMs) não teve nenhum efeito sobre o tamanho do IM, a função do VD, o peso do coração, os pesos absoluto e relativo dos ventrículos e do VD, as propriedades morfológicas estruturais do VD, a morfologia e a contratilidades dos miócitos do VD ($p > 0,05$). Todavia, a associação dos tratamentos

reduziu a amplitude do transiente de cálcio nos miócitos do VD ($p < 0,05$). Concluiu-se que a associação do treinamento físico aeróbio com a terapia com CTMs não afetou a morfologia e a função do VD de ratos com IM induzido no VE.

ABSTRACT

BELFORT, Felipe Gomes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2014. **Influence of aerobic exercise training associated with mesenchymal stem cells therapy in the morphology and function of the right ventricle of rats with infarct induced in the left ventricle.** Advisor: José Antonio Natali. Co-advisors: Thales Nicolau Prímola Gomes, Ricardo Junqueira Del'Carlo e Daise Nunes Queiroz da Cunha.

The aim of this study was to investigate the influence of aerobic exercise training associated with mesenchymal stem cells (MSCs) therapy in the morphology and function of the right ventricle (RV) of rats with infarct (IM) in the left ventricle (LV). Ninety six Wistar male rat (age: 30 days; body weight: $146\text{g} \pm 10\text{ g}$) were randomly divided into experimental groups of 16 animals each: sedentary simulated surgery (SED SHAM); sedentary infarcted (SED IM); sedentary infarcted and treated with MSCs (SED IM CT); exercised simulated surgery (EX SHAM); exercised infarcted (EX IM); and exercised infarcted and treated with MSCs (EX IM CT). At the onset and at the end of experimental period all animals were submitted an incremental exercise test to determine the total exercise time until fatigue (TTF). The maximum running speed (MRS) achieved in this test was used to determine the intensity of the exercise training. Twenty four hours after IM in LV and infusion of the MSCs or simulated operation animals from exercised groups started the running training program with incremental load on a motor- driven treadmill (final velocity: 60 % of MRS, 60min/day, 0° inclination, 5 days/week) that lasted for 12 weeks. The animals from sedentary groups remained in their cages for the same period. At the end of the experimental period, eight animals from each group were used for histological and echocardiographic (ECO) evaluations. Right ventricular myocytes from the remained animals of each group were enzymatically isolated and were for measuring cellular morphology, contractility and intracellular global calcium transient $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (stimulation frequency of 1Hz at a room temperature of $\sim 25^\circ\text{C}$). The results showed that exercised animals presented higher TTF than sedentary ones ($p < 0,05$). The extension of IM was on average 30.40% and it increased heart weight, ventricular weight and ventricular to body weight ratio ($p < 0.05$). No effects of IM on the absolute and relative RV weights were observed. IM decreased RV function (TAPSE: SED IM = $0,54 \pm 0,16\text{ cm}$ vs SED SHAM = $1,40 \pm$

0,21cm) ($p \leq 0,05$), however, no effects of the IM were detected on the RV morphological and structural properties as well as on myocyte morphology ($p > 0,05$). Myocardial infarction increased the amplitude of cell contraction and of the $[Ca^{2+}]_i$ transient ($p < 0,05$) but reduced both the times to peak and to 50% decay of the $[Ca^{2+}]_i$ transient ($p < 0,05$). Cell therapy resulted in a reduction of IM extension (15,00%) and attenuated the decrease in the RV function (TAPSE: SED IM CT = $1,28 \pm 0,17$ cm vs SED IM = $0,54 \pm 0,16$ cm) ($p < 0,05$). However, no effects of cell therapy were found on heart weight, absolute and relative ventricular weights, absolute and relative RV weights, and on RV cell morphology ($p > 0,05$). Cellular therapy reduced ($p < 0,05$) the amplitude and time to peak of cell contraction, decreased the amplitude of the $[Ca^{2+}]_i$ transient and increased the times to peak and to 50% decay of the $[Ca^{2+}]_i$ transient. Exercise training reduced the IM extension (21.33%), but it did not affect heart weight, ventricular weight, ventricular to body weight ratio, absolute and relative RV weight, RV structural morphology as well as cell morphology ($p > 0,05$). Exercise training improved RV function (TAPSE: EX IM = $1,47 \pm 0,17$ cm vs SED IM = $0,54 \pm 0,16$ cm), reduced the amplitude of cell contraction and the time to 50% relaxation ($p < 0,05$) and increased the time to peak of the $[Ca^{2+}]_i$ transient ($p < 0,05$). The combination of treatments (EX + MSCs) had no effects on IM extension, RV function, heart weight, absolute and relative ventricular weights, absolute and relative RV weights, RV structure and cell morphology or cell contractility ($p > 0,05$). However, the associated treatments reduced the amplitude of the $[Ca^{2+}]_i$ transient ($p < 0,05$). In conclusion, the association of aerobic exercise training with MSCs therapy did not affect the right ventricular morphology and function of rats with myocardial infarction induced in the left ventricle

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que o infarto agudo do miocárdio (IM) pode ocasionar uma série de disfunções no coração, desde a sua morfologia, potencial elétrico e transiente de cálcio (Ca^{2+}) durante a contração celular (Pfeffer et al., 1990; Cohn 2000; Zornoff et al., 2009). Por outro lado, o exercício físico regular tem efeito cardioprotetor atenuando os efeitos deletérios após esse evento cardíaco (Wisloff et al., 2002; Diffie et al., 2004; Xu et al., 2008). Outra estratégia terapêutica que tem efeito positivo após um quadro de IM é a terapia com células-tronco (Waring et al., 2012; Cosmo et al., 2012). Todavia, as investigações têm se concentrado no ventrículo esquerdo (VE), local do IM, sendo o ventrículo direito (VD) pouco estudado. Além disso, os efeitos da associação destas estratégias terapêuticas são pouco conhecidos.

1.1 Acoplamento excitação-contração no miocárdio

O acoplamento excitação-contração (AEC) é o mecanismo pelo qual as fibras musculares cardíacas são excitadas através de um estímulo elétrico gerando uma contração, sendo o Ca^{2+} relevante no processo (Bers, 2002a). Para dar início ao AEC, o potencial de ação (PA) promove a despolarização do sarcolema celular e a entrada de Ca^{2+} nos cardiomiócitos (Fabiato & Fabiato, 1975). O influxo desse íon se dá através da abertura de canais específicos conhecidos por receptores de dihidropiridina (DHPR) ou canais de Ca^{2+} tipo L voltagem dependentes. Sabe-se que em roedores os canais de DHPR são os principais meios pelos quais o Ca^{2+} extracelular entra na célula (Bers, 2002a).

Uma vez dentro da célula, o Ca^{2+} promove a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS), processo esse chamado de liberação de Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+} (Fabiato & Fabiato, 1978). Nesse processo, o Ca^{2+} se liga a dois sítios específicos nos receptores de ryanodina do tipo II em cardiomiócitos (RyR2): um de ativação mais rápida para a abertura do canal e outro de grande afinidade, onde se ligará lentamente para desativar o canal (Bers, 2002b). Isso permite a saída de Ca^{2+} do RS através dos RyR₂. Esse evento aumenta a concentração de Ca^{2+} intracelular livre e permite que o Ca^{2+} se ligue à troponina C, mudando a conformação da tropomiosina e

desencadeando a contração (Bers, 2002b). No entanto, após a sístole cardíaca os níveis de Ca^{2+} precisam voltar aos valores basais. Assim, ocorre a dissociação do Ca^{2+} da troponina C, voltando à normalidade a conformação da tropomiosina promovendo o relaxamento cardíaco e esse íon fica livre no citosol.

Para a manutenção da homeostasia fisiológica, os níveis de Ca^{2+} citosólicos devem variar em torno de 100 nM durante a diástole e pode aumentar até $1\text{ }\mu\text{M}$ durante a sístole. Esses gradientes macroscópicos dos níveis desse íon podem ser encontrados por toda a superfície da célula bem como pelas organelas intracelulares. A baixa concentração de Ca^{2+} na diástole previne a toxicidade e a apoptose celular (Bers 2002a; Cheng & Lederer, 2008). Para tal, existem 4 formas para a manutenção dos níveis adequados desse íon no meio celular durante o relaxamento: (A) volta do Ca^{2+} para o RS através da Ca^{2+} ATPase do RS (SERCA2a); (B) trocador sódio-cálcio (NCX), onde a célula promove o transporte de Ca^{2+} para fora da célula às custas da entrada de sódio; (C) bomba Ca^{2+} ATPase sarcolemal; (D) canal mitocondrial uniporte de Ca^{2+} (Bers, 2002ab).

A remoção de Ca^{2+} do citosol celular durante o relaxamento varia de espécie para espécie. Nos ratos, a SERCA2a tem importância primordial nessa recaptação, sendo responsável por 92% da recaptação de Ca^{2+} para o RS, enquanto o NCX responde por 7% da extrusão e o 1% restante é recapturado por outras vias em condição fisiológica normal (Brandes & Bers, 1997). Em cardiomiócitos ventriculares de coelhos, assim como em humanos, a SERCA2a é responsável por retirar 70% de Ca^{2+} do citosol, o NCX responde por 28% e os outros 2% ficam a cargo do canal mitocondrial uniporte de Ca^{2+} e bomba de Ca^{2+} ATP do sarcolema (Bers, 2002a).

A recaptação de Ca^{2+} para dentro do RS pela SERCA2a é dependente da regulação de um inibidor endógeno, a proteína fosfolambana (PLB). Quando a PLB é fosforilada, ela cessa sua função inibitória deixando a SERCA2a desempenhar a sua função de captação de Ca^{2+} para dentro do RS (Bers, 2002a). O mecanismo de controle da PLB envolve a fosforilação de resíduos da serina 16 (Ser-16) pela PKA através de uma via dependente do AMP cíclico e a fosforilação de resíduos de treonina 17 (Thr-17) pela proteína quinase II, essa sendo ativada pela via da Ca^{2+} MKII (Kirchberger et al., 1974).

No que tange aos RyR₂, eles são fosforilados por proteínas específicas como a proteína quinase A (PKA) e C (PKC) e proteína quinase II dependente da via Ca²⁺/calmodulina quinase (Ca²⁺ MKII) (Marks, 2001). A sensibilidade dos RyR₂ ao Ca²⁺ pode ser aumentada pela fosforilação da PKA, aumentando, dessa forma, a atividade desse receptor. Por sua vez, o efeito da Ca²⁺ MKII na fosforilação ou inibição dos RyR₂ ainda não está completamente esclarecido (Takasago et al., 1991; Marks, 2001).

Outras proteínas também participam do AEC. A FKBP 12.6 tem como função estabilizar o canal dos RyR₂ ligando-se à 4 monômeros deste, sendo que a redução na expressão dessa proteína induz uma maior saída de Ca²⁺ do RS e isso pode culminar em eventos de arritmia cardíaca (Lehnart, et al., 2006). E a calceustrina (CASQ2) atua ligando-se ao Ca²⁺ do RS e controla a sensibilidade dos RyR₂ a esse íon, o que pode aumentar a frequência de liberação do Ca²⁺ por essa organela na ocorrência de redução da concentração de Ca²⁺ no citosol da célula (Qin et al., 2008; Stevens et al., 2009). Todas as proteínas citadas acima são muito importantes para a homeostasia do Ca²⁺, tanto no RS quanto no citosol.

Em nível do órgão, as ações coordenadas dessas proteínas no cardiomiócito auxiliam na manutenção da homeostasia de Ca²⁺ do miocárdio. Sabe-se que os ventrículos direito e esquerdo são os responsáveis pela ejeção de sangue para a circulação pulmonar e sistêmica, respectivamente. Assim, o funcionamento coordenado dessas duas câmaras a cada batimento promovem a ação de bombeamento sanguíneo (Vitarelli & Terzano, 2010) que, devido à força de contração gerada, é capaz de enfrentar os gradientes de pressões à qual os ventrículos estão submetidos.

Em pessoas saudáveis, sabe-se que existe uma correlação linear entre a pressão de enchimento do VD (pré-carga) e a pressão arterial pulmonar (pós-carga) (Mc Intyre & Sasahara, 1971). Nessa perspectiva, o VD tem despertado a atenção dos pesquisadores nos últimos anos, principalmente em relação a sua função (Vitarelli & Terzano, 2010), que pode deteriorar em resposta a doenças como insuficiência cardíaca e hipertensão pulmonar, entre outras, gerando, assim, efeitos deletérios no AEC.

1.2 Infarto Agudo do Miocárdio

O infarto agudo do miocárdio reflete a morte dos cardiomiócitos causado por ausência prolongada de oxigênio (O₂) (Davies, 2000). É uma das doenças que mais internam pacientes no Brasil e no mundo promovendo alta da mortalidade (Weir et al., 2006).

Para a ocorrência desse quadro clínico, um ou mais ramos das artérias coronárias devem ser ocluídas parcial ou completamente obstruindo a passagem de sangue para as células do miocárdio culminando numa condição de isquemia e, conseqüentemente, morte celular e redução da função contrátil. Em longo prazo, a isquemia cardíaca promove o remodelamento cardíaco o que reduz a capacidade funcional do coração e aumenta as chances de morte súbita (Pfeffer et al., 1990; Cohn, 2000; Zornoff et al., 2009). O coração é um órgão com capacidade de regeneração limitada devido a sua baixa taxa de mitose. Dessa forma, as células que sobrevivem tentam compensar a redução funcional por hipertrofia, promovendo, assim um remodelamento ventricular adverso (Erlebacher et al., 1984).

Para compreensão das anormalidades oriundas da isquemia cardíaca muitos estudos são realizados em ratos, dada a sua semelhança fisiopatológica com o ser humano (Fishbein et al., 1978), pela acelerada recuperação da lesão isquêmica, baixos custos operacionais, facilidade de manutenção e manipulação destes animais.

Após o IM, dar-se-á então a morte de cardiomiócitos por apoptose e necrose na região infartada. O coração, por sua vez, tenta reparar os efeitos deletérios ocasionados pela isquemia. Após 24 horas, a necrose muscular aumenta e há infiltração de algumas células como os neutrófilos e linfócitos. O processo inflamatório desencadeia a elevação do número de fibroblastos que tem por função aumentar a deposição de colágeno tornando o coração mais fibroso (Fishbein et al., 1978). A fibrose é um marcador do processo de cicatrização e estabilização do infarto. No entanto, essa progressão fibrótica aumenta a rigidez do coração pela deposição de colágenos tipos I e III (Fishbein et al., 1978). No rato, após a oclusão de um vaso coronário, esse processo de deposição e cicatrização demora em torno de 3 a 4 semanas (Fishbein et al., 1978).

O coração com formação de fibrose passa então a ter um prejuízo funcional, tanto macroscopicamente quanto em nível celular e molecular. Assim, observam-se reduções da capacidade de contração e relaxamento, do débito cardíaco (DC) e da fração de ejeção (FE), entre outros.

Por conseguinte, estudos demonstram que quadros de isquemia crônica podem ocasionar perturbações no ciclo do Ca^{2+} e gerar a redução da função cardíaca, bem como aumentar a incidência de quadros de arritmia (Houser et al., 2000; Wasserstrom et al., 2009). Como disfunções no AEC, as doenças cardíacas ocasionam alterações funcionais no sistema contrátil, tais como redução no conteúdo de Ca^{2+} no RS, sendo que a recaptação de Ca^{2+} pelo RS fica prejudicada em função da deficiência de atividade e/ou expressão da SERCA2a. Assim, há uma elevação do Ca^{2+} intracelular, o que torna os RyR_2 mais instáveis e, ao mesmo tempo, mais sensíveis ao Ca^{2+} culminando numa maior frequência de liberação de Ca^{2+} durante a diástole, evento esse conhecido por *sparks* espontâneas de Ca^{2+} (Cheng & Lederer, 2008). Pode, ainda, ocorrer o prolongamento do potencial de ação (Cerbai et al., 1994) e, assim, culminar em arritmia cardíaca.

O processo arritmogênico pode ocorrer de duas formas: primeira, pelo aumento precoce da corrente transitória de influxo (I_{Tl}) após a despolarização da membrana em função da interação entre as correntes de Ca^{2+} despolarizante (I_{Ca}) e a corrente repolarizante de potássio (I_{K+}); e, segunda, pela ativação atrasada da I_{Tl} após a despolarização, por meio da geração de *sparks* espontâneas de Ca^{2+} e, conseqüente, onda de Ca^{2+} fora do tempo normal. Esses dois mecanismos podem produzir atividade elétrica anormal e contrações fora do ritmo fisiológico que prejudicam o mecanismo de contração (Cheng & Lederer, 2008).

1.3 Remodelamento cardíaco após infarto agudo do miocárdio

O coração tem como função bombear e manter um fluxo constante de sangue para todas as regiões do corpo para manter os tecidos nutridos por O_2 e outros nutrientes. O coração é constituído por cardiomiócitos (aproximadamente 30%), sendo as demais células as endoteliais, musculares lisas, fibroblastos e outras células intersticiais inseridas numa matriz extra-celular (ME) bem definida. Estes componentes têm como principal função manter a organização estrutural e o funcionamento cardíaco (Cleutjens et al., 1995).

No entanto, a bomba cardíaca após o IM, sofre adaptações para tentar restabelecer o pleno funcionamento do órgão. Assim, o remodelamento estrutural após

um evento de IM é decorrente de reações inflamatórias exacerbadas na zona infartada e da aceleração da formação de tecido cicatricial. O colágeno presente na zona lesionada pelo IM é produzido por miofibroblastos do tecido de granulação. Já na região não infartada essa deposição de colágeno é realizada por fibroblastos (Cleutjens et al., 1995).

Em condição fisiológica é necessário que haja homeostasia na síntese e degradação de colágeno no miocárdio para a manutenção da estrutura (Weber et al., 1999). Essa manutenção é regulada por alguns fatores como as metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) e os inibidores teciduais de metaloproteinases da matriz (TIMP) (Holmes et al., 2005; Xu et al., 2008).

De maneira geral, os cardiomiócitos mortos após IM serão substituídos por uma cicatriz de colágeno. Não somente os cardiomiócitos mortos da região infartada são afetados, mas também os das áreas adjacentes, uma vez que nessa região ocorre deposição de colágeno e, com isso, perda de complacência e redução da função cardíaca (Weber et al., 1999; Xu et al., 2008). O aumento de tecido fibrótico ocorre de forma reparativa e reativa. A forma reparativa é o mecanismo clássico que ocorre na região de morte celular com conseqüente inflamação do tecido. Já a fibrose reativa relaciona-se ao acúmulo de colágeno na região que não foi afetada diretamente pelo IM (Jugdutt et al., 2003). Vários estudos realizados com animais comprovam esse aumento da deposição de colágeno no coração pós IM (Jugdutt et al., 2003, Xu et al., 2008, Bozi et al., 2013; Ramos et al., 2013).

A isquemia provoca a perda de sustentação da ME tornando o tecido nessa região mais distensível e mais susceptível a deformações. Neste sentido, podem ocorrer deslizamentos das áreas musculares necróticas, com realinhamento dos cardiomiócitos da parede infartada (Zornoff et al., 1997). Esse quadro gera, então, um processo de adelgaçamento da área atingida pela intensa degradação do colágeno intersticial. Este processo dilata o ventrículo, afinando e distendendo a parede dessa cavidade, processo esse conhecido como expansão da área infartada (Whittaker et al., 1991). Após o processo de formação fibrótica ocorre o aumento da sobrecarga volumétrica no miocárdio não afetado, bem como a fibrose reativa e a mudança da geometria ventricular gerando um quadro de hipertrofia compensatória dos cardiomiócitos. Algumas semanas após o IM pode ser constatada a hipertrofia cardíaca através da

dilatação do VE e alteração da geometria dessa cavidade (Zornoff et al., 1997; Zornoff et al 2009).

A hipertrofia celular decorrente da isquemia é patológica e está associada à disfunção cardíaca, arritmia e morte súbita (Frey & Olson, 2003), além de ser um fator de risco independente para o desenvolvimento da falha cardíaca (Lorell & Carabello, 2000). O objetivo dessa hipertrofia é retornar o estresse parietal ao normal, contudo, a sobrecarga de volume aumenta a pré-carga e promove a dilatação da cavidade gerando a hipertrofia excêntrica. Esse mecanismo, a princípio, visa manter a homeostasia cardíaca em relação DC. Entretanto, o que ocorre, progressivamente, é a precarização das funções cardíacas pelo aumento progressivo da ativação neuro-humoral (Pfeffer et al., 1990; Cohn et al., 2000; Zornoff et al., 1997; Zornoff et al., 2009). Litwin (1995) observou que as concentrações plasmáticas de noradrenalina estão aumentadas, precocemente, após o infarto. Esta ativação do sistema nervoso simpático (SNS) parece estar relacionada ao tamanho da área infartada e às consequências hemodinâmicas do insulto isquêmico.

A complexidade dessa reação no tecido cardíaco parece passar primeiramente pela exacerbação da atividade do SNS e do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA). Assim, após o IM, ocorre a ativação aguda do SNS como resposta de adaptação do evento isquêmico e tem por finalidade a restauração ou manutenção dos níveis pressóricos e do DC. Cronicamente, entretanto, a redução da função sistólica pode gerar aumento na atividade simpática (Middlekauff et al., 1998). Por conseguinte, ocorre aumento da enzima conversora de angiotensina (ECA) no coração como um todo, particularmente no tecido cicatricial, ocasionando aumentos locais da concentração de Angiotensina II (Ang II) (Busatto et al., 1997; de Resende et al., 2006). A formação de Ang II, sendo a sua ação modulada por receptores de Angiotensina II do tipo 1 (AT1), gera aumentos dos níveis cardíacos de aldosterona. O aumento desses compostos (Ang II e aldosterona) são os principais mediadores de hipertrofia de miócitos e fibrose cardíaca. Estudos tem demonstrado que a inibição da ECA em ratos infartados reduz a mortalidade, atenua a fibrose reativa, a hipertrofia de miócitos e a progressão para a insuficiência cardíaca (Pfeffer et al., 1985; Mill et al., 1994; Busatto et al., 1997; de Resende et al., 2006).

Essas mudanças no tamanho, massa e geometria ventricular caracterizam, clinicamente, o processo de remodelamento cardíaco após o IM. É importante ressaltar que o processo de remodelamento é complexo, implicando em alterações celulares e moleculares (Pfeffer et al., 1985; 1990; Zornoff et al., 1997; Cohn et al., 2000). *In vivo*, foi reportado que o IM experimental em modelo animal ocasiona redução em diversos parâmetros funcionais hemodinâmicas como: DC, FE, pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), taxa máxima de elevação de pressão (dP/dtmax) e taxa máxima de queda de pressão (dP/dtmin). Paralelamente, ocorre elevação da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) (Pfeffer et al., 1991; Fletcher et al., 1981; de Waard et al., 2007; Xu et al., 2008).

No que tange à contratilidade, estudos experimentais demonstram que a isquemia altera a capacidade de contração dos cardiomiócitos (Piacentino et al., 2003; Bito et al., 2010, Bozi et al., 2013; Kemi et al., 2012; Bito et al., 2013; Ramos et al., 2013). Em trabalho realizado pelo nosso grupo, Bozi e colaboradores (2013) observaram que o IM experimental deteriorou a amplitude de contração celular bem como na PDFVE, PSVE, dP/dtmax e dP/dtmin do VE. Resultados similares em relação à deterioração da função cardíaca, bem como da contratilidade cardíaca, são vistos em outros trabalhos (Xu et al., 2008; Ramos, 2013).

Ainda em nível celular, a perda da função cardíaca após o IM pode estar associada com o comprometimento da capacidade contrátil intrínseca dos cardiomiócitos (Holt et al., 1998; Zhang et al., 1999; Loennechen et al., 2002; Wisloff et al., 2002; de Waard et al., 2007, Bito et al., 2010). Estudos com cardiomiócitos isolados de animais com IM experimental demonstraram que a amplitude de contração pode estar reduzida (Holt et al., 1998; Loennechen et al., 2002; de Waard et al., 2007; Bito et al., 2010; Bozi et al., 2012). Essas alterações podem ocorrer em resposta à redução no transiente intracelular global de cálcio (transiente de $[Ca^{2+}]_i$) e/ou na sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} (Holt et al., 1998; Wisloff et al., 2002; Loennechen et al., 2002; de Waard et al., 2007; Ait Mou et al., 2008; Bito et al., 2010). Além disso, o tempo de contração celular apresenta-se aumentado (Wisloff et al., 2002, Bito et al., 2010). Essa alteração pode estar relacionada com a redução na expressão de proteínas regulatórias do influxo de Ca^{2+} para o citosol, tais como RyR_2 , presentes na membrana do RS (Guo et al., 2003; Sallinen et al., 2007). Da mesma forma, o tempo de

relaxamento celular está aumentado após o IM (Holt et al., 1998; Loennechen et al., 2002; Wisloff et al., 2002). Esse aumento está relacionado com alterações na expressão das proteínas responsáveis pela remoção do Ca^{2+} do citosol, tais como redução na expressão da SERCA2 (Gupta et al., 2000; Wisloff et al., 2002; Guo et al., 2003; Sallinen et al., 2007; Mackiewicz et al., 2008) e do NCX (Gupta et al.; 2000; Wisloff et al., 2002; Sallinen et al., 2007).

O remodelamento cardíaco do VE após infarto está bem descrito na literatura, no entanto, faltam evidências sobre possíveis alterações no VD. Sabe-se que os ventrículos são separados apenas pelo septo interventricular (SIV) de tal maneira que os dois ventrículos são obrigados a bombear o mesmo volume sistólico efetivo apesar de enfrentarem diferentes gradientes de pressão (Vitarelli & Terzano, 2010).

O ventrículo direito, em relação ao VE, por ser uma câmara menor, necessita de uma menor oferta de O_2 por possuir uma parede livre mais estreita e por enfrentar uma menor pré-carga e pós-carga. Essa menor necessidade de oxigênio em repouso concede ao VD uma maior capacidade reserva de extração desse gás em situações de estresse, como no caso de isquemias cardíacas (Vitarelli & Terzano, 2010).

Sabe-se que a disfunção no VE é um importante precursor de disfunção no VD (Marmor et al., 1981). Os mecanismos pelos quais o IM no VE determina disfunções no VD ainda não estão bem estabelecidos. Sabe-se que a disfunção no VD pode desenvolver em associação com a disfunção no VE via múltiplos mecanismos: (1) falência no VE aumentada no pós-carga devido ao aumento das pressões nas veias pulmonares e nas artérias pulmonares, parcialmente, como mecanismo protetor contra o edema pulmonar (Setaro et al., 1992); (2) o mesmo processo cardiomiopático pode afetar simultaneamente o VD; (3) a isquemia do miocárdio pode envolver ambos os ventrículos; (4) a disfunção no VE pode levar à diminuição do sangue direcionado para a perfusão coronária do lado direito do coração, que pode ser um substancial fator na função do VD (Klima et al., 1999); (5) ocorrência de disfunção no SIV e a interdependência ventricular; e (6) dilatação do VE num compartimento pericárdico restringindo a função diastólica do VD. Por causa desses vários fatores afetando a função do VD devido à insuficiência no VE, o status do VD pode constituir uma via comum final na progressão da insuficiência cardíaca congestiva e assim ser um indicador de descompensação ou diagnóstico ruim (Voelkel et al., 2006).

No entanto, estudos têm demonstrando que a função do VD pode ser independente da função do VE e que a disfunção no VD seja mais dependente da localização e extensão do infarto do que da extensão da disfunção no VE (Pfisterer et al., 1986; Zornof et al., 2002).

A maior parte dos estudos com VD analisam somente alguns parâmetros dessa câmara, na sua maioria relacionada à sua função, para somar dados na análise das propriedades mecânicas, contráteis, celulares e moleculares no VE infartado (Balakumar & Singh, 2006; De Waard et al., 2007; Portes et al., 2009; Jorge et al., 2011). Em contrapartida, outra parte dos trabalhos científicos é realizada com humanos que possuem algum tipo de disfunção no VD (Zornoff et al., 2002; Pinamonti et al., 2011; van Nierop et al., 2013) ou ainda com modelos experimentais, tais como bandagem da artéria pulmonar e bloqueio aorto-caval (Piao et al., 2010; Bartelds et al., 2011)

As alterações das propriedades mecânicas e contráteis do VD ocasionadas por um IM no VE são pouco conhecidas. Nessa perspectiva, Nahrendorf e colaboradores (2003) realizaram um estudo sobre os efeitos de um IM no VE em relação ao remodelamento do VD de ratos Wistar. Análises espaço-temporais bem definidas (4, 8 e 16 semanas após o evento isquêmico) foram feitas nos animais infartados. Após medidas hemodinâmicas do volume e do desempenho do VD através de imagens de ressonância magnética, encontrou-se alteração da curva de pressão-volume em direção a um maior volume e redução do índice de pico de volume sistólico pelo peso do VD 16 semanas após o IM. Observaram também, com o passar do tempo, aumento da pressão sistólica nessa cavidade, sendo que isso contribuiu para o ganho de peso no VD. Os autores concluem que essas alterações podem ocorrer em função da manutenção do balanço de sobrecarga no VD após IM no VE, sendo esse fator responsável pelos resultados encontrados.

Em outro estudo, Maheshwari & Mittal (2013) compararam a fração de ejeção do VD (RVEF) com o índice de desempenho do VD (RV-MPI) para predizer a função cardíaca em pacientes com infarto no VE. Os autores encontraram que, apesar dos valores normais encontrados na RVEF, o RV-MPI apresentava-se prolongado nos indivíduos infartados sugerindo que o RV-MPI é uma avaliação simples, sensível e precisa, em comparação a RVEF, para a avaliação da função do VD.

Assim, no presente momento, até onde foi possível pesquisar, não foram encontrados estudos sobre as alterações das propriedades mecânicas de cardiomiócitos do VD ocasionadas por um IM no VE. Portanto, estudos nesta temática são necessários.

1.4 Terapia com células-tronco e infarto agudo do miocárdio

Terapias não farmacológicas têm sido empregadas visando combater os efeitos deletérios do IM, dentre elas a terapia com células-tronco tem demonstrado benefícios. Diferentes tipos vêm sendo utilizadas (células-tronco embrionárias, hematopoiéticas, mesenquimais e outras progenitoras circulatórias) (Crisostomo et al., 2007). As células-tronco mesenquimais (CTMs) são hipoinmunogênicas, pois deixam de expressar HLA classe 2 e moléculas co-estimulatórias, previnem a resposta das células T direta e indiretamente e induzem um microambiente local através da produção de prostaglandinas e interleucinas (Monteiro et al., 2010; Gneccchi, Daniele, Cervio, 2012).

As moléculas bioativas secretadas pelas CTMs exercem efeitos tróficos no tecido adjacente, acarretando efeitos antiapoptóticos nas células tecido-específico, efeitos imunomodulatórios sobre as células do sistema imune, aumento da angiogênese e quimiotaxia para outras células jovens comprometidas com o processo de reparação (Seo & Cho, 2012). Assim, pode ocorrer redução da resposta inflamatória inicial após algumas doenças isquêmicas, restabelecimento do suprimento vascular e reparação adequada do tecido, dependendo da extensão e gravidade dos danos tissulares (Monteiro et al., 2010).

Após uma lesão isquêmica, células residentes proliferam e diferenciam-se em cardiomiócitos, células de músculo liso e endoteliais (Bollini et al., 2010). No momento do IM, a isquemia no miocárdio desencadeia a liberação de citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas, o que promovem a mobilização de células-tronco a partir de outros nichos e o seu direcionamento para a região danificada (Frangogiannis, 2008). Esses efeitos à distância garantem a sobrevivência dos cardiomiócitos danificados, promovem diferenciação e proliferação de células-tronco, além de participarem na criação de novos vasos sanguíneos. Todos esses efeitos contrapõem-se ao remodelamento adverso do miocárdio e ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca (Mirotsoy, et al., 2011).

Todavia, apesar dos efeitos imunomodulatórios intrínsecos exercerem papel importante na regeneração do miocárdio, este tecido ainda não é capaz de “curar-se” sozinho. Dessa forma, a terapia com CTMs derivadas da medula óssea atua como coadjuvante no processo de regeneração do coração e qualquer fator que potencialize as fases de regeneração do miocárdio são importantes. Apesar das pesquisas com células-tronco ainda não responderem algumas questões, tais como: a dosagem mais adequada de células após IM; a janela terapêutica apropriada; e o tipo de infusão mais eficaz, o estudo de Lavorato (2014) demonstrou que o tratamento com CTMs (dose única de 1×10^6 , por administração intravenosa via veia caudal imediatamente após IM), após 12 semanas da aplicação, promoveu aumento na fração de ejeção e de encurtamento e reduziu a amplitude e o tempo para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$.

1.5 Efeitos do exercício físico após infarto agudo do miocárdio

O exercício físico é considerado uma alternativa de intervenção não farmacológica na prevenção e tratamento de diferentes patologias, desde doenças crônicas como diabetes, dislipidemias e hipertensão, entre outras, até mesmo em relação às alterações patofisiológicas ocasionadas por um IM. Por exemplo, Pescatello e colaboradores (2004) demonstraram que a realização de atividade física possui uma correlação inversa com o número de mortalidade por doenças cardíacas. Resultados parecidos foram encontrados por Jorge et al. (2011) onde o treinamento em esteira em ratos reduziu a taxa de mortalidade, as disfunções cardíacas e periféricas, bem como preservou o controle autonômico após IM.

Dessa forma, vários trabalhos têm investigado as diferentes estratégias de intervenção com exercício físico para contrapor aos efeitos deletérios provocados pelo remodelamento cardíaco pós-infarto. Todavia, a grande maioria dos estudos trata do VE, dada a importância do remodelamento ventricular após IM e os efeitos benéficos do exercício físico numa condição de isquemia cardíaca. Em contraste, pouca atenção tem sido dada às adaptações do VD nesta condição de IM.

1.5.1 Efeitos do exercício físico no VE após infarto agudo do miocárdio

Os efeitos do exercício físico sobre o miocárdio infartado vêm sendo estudados há alguns anos. Assim, diferentes cargas, tipos de exercício e diferentes tempos de início do exercício antes e após o IM foram reportados. A maioria dos trabalhos aponta para um efeito cardioprotetor do treinamento físico ao miocárdio infartado. Especula-se que quanto mais rápido for iniciado o protocolo de exercício, maiores são as chances de atenuação dos efeitos deletérios do IM visto que o processo cicatricial ainda não está completo. Assim, essas alterações benéficas, na sua maioria, perpassam pela redução da formação de cicatriz no coração bem como melhoras na contratilidade celular cardíaca e do transiente de $[Ca^{+2}]_i$.

Embora os efeitos do treinamento físico sobre as disfunções cardíacas ocasionadas por um IM sejam bem estudados (Kloner e Kloner, 1983; Wislof 2002; Gaudron et al., 1994; de Waard et al., 2007; Wu et al., 2008; Xu et al., 2008; Bito et al., 2010; Bozi et al., 2012; Kemi et al., 2011; Jorge et al., 2011; Kemi et al., 2012; Cosmo et al., 2012; Ramos et al., 2013), poucos ainda são os estudos que investigaram os efeitos de um programa de atividade física iniciado 24hs após um IM (Hammerman et al., 1983; De Waard et al., 2007; Wu et al., 2008; Bito et al., 2010; Ramos et al., 2013).

Gaudron e colaboradores (1994) utilizaram um protocolo de natação onde os ratos nadavam 90 minutos/dia, 6 dias na semana, por 8 semanas. O treinamento foi iniciado 4 e 21 dias após o IM em ratos *Wistar*. Foi demonstrado que o treinamento promoveu agravamento da dilatação global do VE sem alterações na sua morfologia. O treinamento agravou o remodelamento, deixando-o incompatível com a vida em 27% dos ratos que iniciaram o treinamento 21 dias após o IM e 48% dos que iniciaram 4 dias após esse evento cardíaco. Nesses ratos, a dilatação severa global do VE, a distorção do corpo do VE, o afinamento da cicatriz e a redução do espessamento do septo foram detectados.

Em outro estudo, Hammerman et al. (1983) realizaram um treinamento com natação durante 7 dias, iniciado 24hs após a oclusão coronária. A sessão de treinamento do primeiro dia durou 5 minutos e sua duração foi aumentada progressivamente de modo que ao final do sétimo dia durou 45 minutos. Nas duas semanas seguintes os ratos realizaram atividade regular, sem o treinamento na água. Os autores encontraram marcado afinamento da cicatriz oriunda do IM e sugeriram que parece existir um período inicial de tempo no qual o exercício físico de natação pode promover aumento

da tensão ventricular, afinamento acentuado na cicatriz miocárdica e distorção na parede infartada que foi seguido por uma deposição de colágeno e culminou numa alteração da topografia do VE.

Por sua vez, Kloner e Kloner (1983) iniciaram o protocolo de treinamento em natação 7 dias após o IM em ratos. A sessão de treinamento foi iniciada com 15 minutos de duração e foi aumentada, progressivamente, 5 minutos por dia, até os animais alcançarem 40 minutos de exercício. Os autores encontraram um afinamento da cicatriz do miocárdio nos animais que realizaram exercício. Assim, concluíram que o treinamento nessa fase de recuperação após o IM pode comprometer o funcionamento do coração devido à redução do débito cardíaco, bem como devido a maior demanda de oxigênio.

Em relação exercício físico regular de corrida sobre o IM, em nível celular, Xu e colaboradores (2008) investigaram os efeitos de um protocolo de treinamento em esteira uma semana após IM. Os animais se exercitaram por 8 semanas, 5 dias por semana, inclinação de 5°, sendo que a velocidade e duração da sessão de treinamento foram gradualmente aumentados até que fosse atingido 16 m/min, durante 50 minutos. Observaram que o treinamento regular aumentou a relação de metaloproteínases da matriz extracelular e inibidores teciduais das metaloproteínases da matriz extracelular, reduzindo a expressão da última, o que atenua a expressão da enzima conversora de angiotensina e do receptor de angiotensina II tipo 1. Isto resultou em menor formação fibrosa preservando, assim, a função miocárdica.

No estudo de Wu e colaboradores (2008) procurou-se investigar em ratos os efeitos de 3 dias de exercício (corrida em esteira) a 17km/h, prévio ao infarto, e mais 3 dias de corrida em esteira a 12 m/min, 24 hs após IM, sobre a propriedade da VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular). Os autores demonstraram que o exercício aumentou a expressão da VEGF pré IM, bem como uma redução na área do infarto, juntamente com a formação de novos capilares no miocárdio.

O estudo de Bozi e colaboradores (2013) utilizou um programa progressivo de corrida em esteira (5 dias/semana, 60 min/dia, 18 m/min, 10° de inclinação por 8 semanas), prévio ao IM, e encontrou uma redução dos efeitos deletérios do IM e no tamanho deste com menor deposição de colágeno, aumento na amplitude de contração

celular, e velocidade de contração-relaxamento em cardiomiócitos do VE de ratos *Wistar*.

Bito e colaboradores (2010) constataram que a AF em roda voluntária, logo após o IM, restaurou a contratilidade de cardiomiócitos do VE, bem como melhorou a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} , além de ter um efeito benéfico na homeostasia desse íon durante a diástole. Em outro estudo com camundongos (De Waard et al., 2007), foi aplicado um protocolo de treinamento físico, com início 24 horas pós-infarto, por 8 semanas em roda voluntária. Os autores reportaram que o treinamento preveniu a redução da capacidade de geração de força dos cardiomiócitos, induzida pelo IM. Ainda, melhorou a fração de encurtamento do VE e atenuou a congestão pulmonar. O exercício reduziu também a concentração de Ca^{2+} diastólico, bem como aumentou a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} .

Em trabalho prévio do Laboratório de Biologia do Exercício do Departamento de Educação Física da UFV (Ramos, 2013), foi mostrado que um treinamento de corrida em esteira com intensidade de 65-75% por 7 semanas, iniciado 24 horas após o IM, não agravou o remodelamento cardíaco e atenuou modificações adversas resultantes do IM em parâmetros hemodinâmicos do VE reduzindo a dP/dt_{min} e a FC de repouso além de aumentar a PSVE dos animais IM. Recentemente, em outro estudo do mesmo laboratório (Lavorato, 2014) demonstrou-se que o treinamento físico aeróbico por 12 semanas, iniciado 24 horas após o IM, 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 SERCA 2a e da fosfolambam fosforilada na serina-16 no VE.

Portanto, os efeitos benéficos do treinamento físico dependem tanto da carga de exercício (intensidade e duração) quanto do tempo de início após o IM. Acredita-se que quanto mais precoce for o início do protocolo de treinamento após IM maiores serão os benefícios auxiliando na redução da formação fibrosa e função cardíaca.

1.5.2 Efeitos do exercício físico no VD após infarto do miocárdio no VE

Comparado com o VE, são poucos os trabalhos que abordam o treinamento físico sistematizado e os seus efeitos sobre as propriedades mecânicas, morfológicas, celular e molecular do VD. A maior parte dos trabalhos analisa o VD através de

imagens ecocardiográficas ou mesmo ressonância magnética, logo após a realização de um teste físico, para verificação da funcionalidade dessa câmara em indivíduos com IM.

Neste sentido, Weiner e colaboradores (1983) caracterizaram as alterações ocorridas no VD em 19 pacientes com doença cardíaca crônica através de exercício realizado em cicloergômetro por 4 minutos. Os pacientes foram divididos em 2 grupos: grupo 1, sendo composto por 9 pacientes nos quais a pressão média no átrio direito não aumentava mais que 7mmHg em exercício. Os outros 10 se enquadravam no grupo 2, nos quais a pressão média do átrio direito aumentava acima 7mmHg em exercício. Foram reportados maior consumo de O₂ pós-exercício no grupo 2 comparado ao 1. Encontraram aumento da pressão pulmonar durante a diástole e sístole no VD, aumento da pressão arterial pulmonar média, aumento da pressão média nos capilares pulmonares durante o exercício e uma ótima correlação entre a média da pressão átrio direito e a média da pressão arterial pulmonar. Assim, concluíram que a relação pré versus pós-carga é alterada durante as doenças cardíacas crônicas sendo que o exercício pode promover aumento da pressão arterial pulmonar.

A disfunção no VD e a capacidade de exercício após IM foi avaliada em outro estudo em humanos (Smarz et al., 2012). Para tal, foram realizadas análises por ecocardiografia em pacientes que realizaram angioplastia coronária e que possuíam ou não disfunção no VD. Foi realizado um teste cardiopulmonar em esteira rolante uma semana antes da intervenção cirúrgica e após o procedimento. Os pacientes com disfunção ventricular no lado direito do coração apresentaram redução do percentual de alteração da área fracional do VD assim como diminuição da função do VD como demonstrado através da excursão através do plano anular da valva tricúspide. Os autores concluíram que essa disfunção pode ser ocasionada por distúrbios na parede livre do VD, necrose do septo interventricular ou adormecimento do miocárdio.

O estudo de Dell' Itália e colaboradores (1987) testou a capacidade de exercício em bicicleta em pacientes após IM no VD durante um período de 1 a 4 anos. Eles demonstraram que o limiar anaeróbico correlaciona-se com o pico de FE no VD em exercício, mas não com a FE do VE.

Völkens e colaboradores (2013) investigaram a liberação de troponina T em pacientes com hipertensão arterial pulmonar (PAH) em resposta a uma atividade física máxima em 24 pacientes com PAH. Os níveis de troponina no VD foram avaliados

antes e 30, 180 e 300 minutos após o exercício. Os autores encontraram níveis de troponina significativamente aumentados no pacientes com PAH com o passar do tempo pós-exercício. Este trabalho fornece evidências de que os níveis de troponina podem ser utilizados como um biomarcador no VD para avaliações dos riscos patofisiológicas e individuais em pacientes com PAH.

Outro estudo (Westhoff-Bleck et al., 2013) avaliou 48 pacientes após realização de cirurgia de redirecionamento de fluxo sanguíneo no VE seguindo um protocolo de treinamento sistematizado por 24 semanas. Em relação aos efeitos encontrados no VD, o treinamento melhorou a capacidade de exercício bem como aumento do tempo de tolerância a este sem efeitos na capacidade funcional do VD, tanto em relação ao volume quanto na função ventricular.

No entanto, os efeitos do treinamento no VD ainda não estão esclarecidos nos poucos estudos que existem. A exemplo, alguns estudos demonstram melhoras na capilarização do tecido bem como melhora da função (Anversa et al., 1987; Li et al., 1986) sendo que outros não foram capazes de documentar alterações na contratilidade do VD (Williams & Potter, 1976).

Em nível celular, em um trabalho recente (Carneiro-Júnior, et al., 2013) foi comparado cardiomiócitos do VE e do VD de ratos *Wistar* normais. Foram verificadas alterações benéficas de um protocolo de treinamento aeróbico de 8 semanas no tempo para o pico do transiente bem como no tempo para 50% de decaimento transiente de $[Ca^{2+}]_i$ no VE de animais sadios sem modificações no VD. No que tange a contratilidade, foram verificados aumentos na fração de encurtamento, na velocidade máxima de encurtamento bem como velocidade máxima de relaxamento celular oriundos do exercício somente no VE.

Portanto, em animais infartados, mais estudos são necessários para um melhor conhecimento do impacto do exercício físico aeróbio no VD destes animais.

1.5.3 Efeitos do exercício físico associado à terapia com CTs após infarto do miocárdio

No que tange a utilização tanto do treinamento físico como da terapia com células-tronco no combate aos efeitos negativos do IM, estudos tem apontado os

aspectos positivos dessa associação terapêutica no tratamento desse evento cardíaco. Lunde e colaboradores (2007) demonstrou que o grupo que recebeu terapia celular com células tronco mononucleares da medula óssea melhoraram a capacidade de exercício, o consumo de oxigênio e aumentou o pico da FC e no percentual da FC de reserva.

Contudo, o estudo de Straburzyńska-Migaj et al. (2012) verificou que a capacidade de exercício, o perfil de risco de arritmias, bem como a função pulmonar, não são influenciados pela terapia com células-tronco da medula óssea. Neste estudo 45 pacientes foram divididos em grupos placebo e tratado com células-tronco, sendo que essas eram aplicadas diretamente na artéria relacionada ao IM. Posteriormente os sujeitos eram submetidos a um teste físico cardiopulmonar. Através de análises de ECG, foi verificado que os pacientes com terapia celular não melhoraram a sua capacidade de exercício.

Outro estudo (Davies et al., 2010) investigou a influência do transplante de células-tronco do cordão umbilical humano no desempenho do VD em modelo neonatal de ovinos, após esses sofrerem bandagem artério-pulmonar. A forma de aplicação das CTs hematopoiéticas foi via intra-cárdica e foram realizadas avaliações da função do VD no início e um mês após a cirurgia. Foi constatado que o grupo que recebeu CTs melhorou a função diastólica em comparação ao seu grupo controle. Os autores concluíram que o aumento da sobrecarga no VD, em resposta à cirurgia, e as células-tronco do cordão umbilical melhoraram a função do VD.

No estudo de Cosmo e colaboradores (2012), foi investigada a associação de um treinamento de natação (30 dias pós IM - 15 min, 3x / semana por 30 dias) com células-tronco mononucleares em ratos *Wistar* com IM. Logo após o IM foi ministrada uma injeção intramiocárdica de células-tronco entre a região do IM e o miocárdio íntegro. Os autores concluíram que a associação do treinamento físico com a terapia com células-tronco foi eficaz contra as ações deletérias do remodelamento adverso no VE, constatado através da maior FE e menor deposição de colágeno.

Em nível celular, todavia, os efeitos do exercício físico associado à terapia com células-tronco sobre o VD de animais com IM experimental não são conhecidos. Recentemente, o estudo de Lavorato (2014) demonstrou que a associação do treinamento físico aeróbio, iniciado 24 horas após o IM e com duração de 12 semanas,

com a 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} em miócitos isolados do VE.

Portanto, é evidente a lacuna no conhecimento em relação aos efeitos do exercício físico aeróbio associado à terapia com células-tronco sobre no VD, após um IM no VE, bem como os efeitos em nível celular no VD.

2 OBJETIVO

Verificar a influência do treinamento físico aeróbio associado à terapia com células-tronco mesenquimais na morfologia e função do VD de ratos com infarto induzido no VE.

2.2 Objetivos Específicos:

Verificar os efeitos do treinamento físico aeróbio com duração de 12 semanas, iniciado 24 horas após infarto, associado à terapia com CTMs sobre:

- ✓ Função do VD;
- ✓ Morfologia estrutural do VD;
- ✓ Morfologia dos cardiomiócitos do VD: comprimento (C), largura (L), volume e razão C/L;
- ✓ Contratilidade celular e o transiente intracelular global de Ca^{2+} do VD.

3 HIPÓTESE

Diante dos benefícios promovidos pelo treinamento físico aeróbio e pelo transplante de CTMs na condição de IM, a hipótese do presente estudo foi que a associação dos tratamentos potencializa os efeitos na morfologia, na função do VD, na contratilidade celular e no transiente intracelular global de Ca^{2+} de cardiomiócitos isolados do VD de ratos com infarto induzido no VE.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais e desenho experimental

Foram utilizados 96 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, com cerca de 30 dias de idade e peso corporal de $146 \text{ g} \pm 10\text{g}$. Os animais foram obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

Os animais foram alojados em caixas de polietileno em grupos de 5 animais por caixa, com livre acesso a ração comercial e água. O ambiente foi mantido com temperatura média de 22°C e regime de luminosidade de 12/12 horas escuro/claro. O peso corporal foi obtido no início e ao final do experimento utilizando-se balança eletrônica digital (AS5500C, Marte Balanças e Equipamentos, SP, Brasil).

Após aclimação de sete dias, os animais foram, aleatoriamente, distribuídos em 6 grupos experimentais a seguir:

- Sedentário Sham (SED SHAM, n = 16): animais submetidos à cirurgia simulada e não submetidos ao programa de corrida em esteira;
- Exercitado Sham (EX SHAM, n = 16): animais submetidos à cirurgia simulada e submetidos ao programa de corrida em esteira por 12 semanas;
- Sedentário Infartado (SED IM, n = 16): animais submetidos à ligadura da artéria coronária anterior descendente esquerda (ACADE) (infarto) e não submetidos ao programa de corrida em esteira;
- Exercitado Infartado (EX IM, n = 16): animais submetidos à ligadura da ACADE (IM) e ao programa de corrida em esteira por 12 semanas.
- Sedentário Infartado com terapia com células-tronco (SED IM CT, n = 16): animais submetidos à ligadura da ACADE (IM) com posterior terapia com CTMs e não submetidos ao programa de corrida em esteira;
- Exercitado Infartado com terapia com células-tronco (EX IM CT, n = 16): animais submetidos à ligadura da ACADE (IM) com posterior terapia com CTMs e submetidos ao programa de corrida em esteira por 12 semanas.

O presente trabalho foi conduzido com base nos procedimentos éticos relacionados ao uso e cuidado com animais de laboratório de acordo com os Princípios

Éticos na Experimentação Animal, elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da (Universidade Federal de Viçosa sob o protocolo nº (05/2013).

O desenho experimental do estudo pode ser visualizado na figura 1 abaixo.

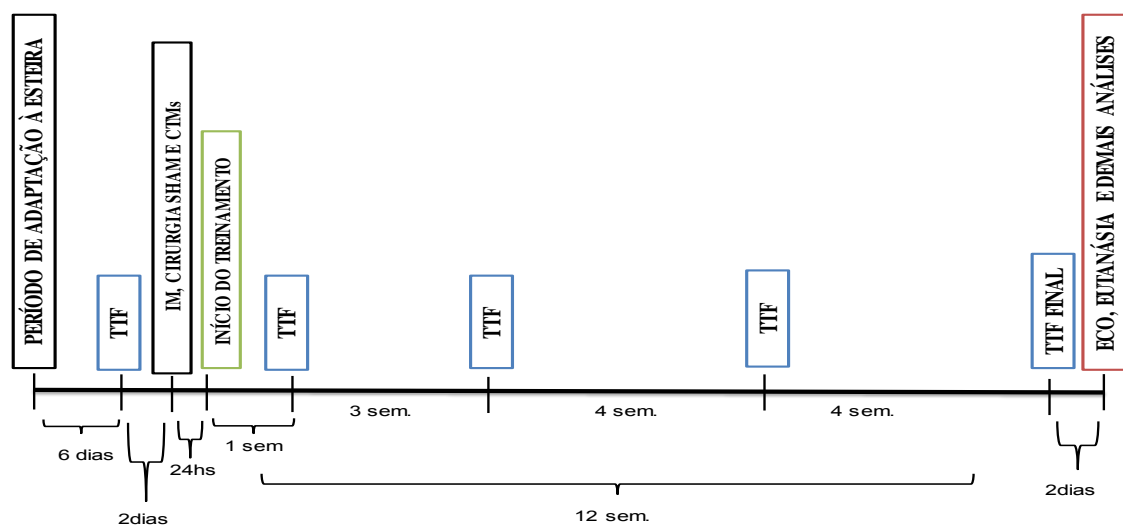


Figura 1: Figura representativa do desenho experimental do presente estudo: essa linha temporal representa os procedimentos aos quais um animal foi submetido até a eutanásia. TTF: Teste do tempo total de exercício até a fadiga; ECO: Ecocardiografia; IM: Infarto agudo do miocárdio; CTMs: Células-tronco mesenquimais.

4.2 Indução do Infarto

4.2.1 Anestesia

No pré-operatório imediato, foi administrada intraperitonealmente (IP) antibioticoterapia (enrofloxacina 10 mg/kg) em dose única. Os animais foram anestesiados em câmara de indução com isoflurano 3% e oxigênio 100% em fluxo constante de 1 mL/minuto. Posteriormente, foram posicionados em decúbito dorsal para proceder-se a intubação endotraqueal. A frequência de 20 movimentos respiratórios/minuto e a ausência de tônus mandibular serviram de parâmetros para determinar o momento ideal da intubação, por meio de um sistema para pequenos

animais composto de fibra ótica (BioLite, BioTex, Houston, TX) e um cateter intravenoso de 16 a 18 gauges e 2,54 cm de comprimento adaptado como sonda.

Na sequência, os animais foram submetidos à ventilação por pressão positiva intermitente (Inspira Advanced Safety Single Animal Pressure/Volume Controlled Ventilators, Harvard Apparatus, Massachusetts) e a frequência respiratória estabelecida entre 50 e 60 movimentos/minuto, com pressão inspiratória entre 16 e 18 cm H₂O e relação inspiração/expiração de 1:1. A anestesia foi mantida com isoflurano diluído em oxigênio 100%, com concentração ajustada para manter o plano anestésico adequado.

4.2.2 Esternotomia e infarto do miocárdio

Os animais foram mantidos em decúbito dorsal com os quatro membros imobilizados sobre uma caixa de polietileno, seguido de ampla tricotomia da região torácica e antissepsia com povidine tópico. 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 ACADE foi feita tendo como referência o apêndice atrial esquerdo. A ligadura foi feita a uma distância de aproximadamente 2 mm do apêndice atrial esquerdo, com fio monofilamentar 6-0. O ponto foi profundo o suficiente para assegurar que a ACADE fosse bloqueada, sendo que o empalidecimento da região inferior do coração serviu como referência para confirmar a ligadura. O eletrocardiograma (ECG), na derivação DII (PowerLab device, ML865, ADInstruments, São Paulo) foi realizado para documentar as alterações eletrofisiológicas decorrentes da ligadura da ACADE em dois momentos: basal e imediatamente após o IM.

A cavidade torácica foi fechada por duas camadas de suturas de náilon 4-0 em níveis muscular e cutâneo. Antes de completar a última sutura do tórax, uma pressão positiva ao final da expiração foi exercida e mantida por aproximadamente 2 segundos com a finalidade de expandir os pulmões ao máximo e restabelecer a pressão negativa torácica. No transoperatório, a temperatura corporal foi mantida em 37,5°C, por meio da

transferência de calor oriundo de bolsas de água aquecidas e colocadas dentro da caixa usada para contenção.

4.2.3 Cuidados pós-operatórios

Os cotonetes que foram utilizados para secar eventuais sangramentos foram pesados para análise da perda volêmica por hemorragia no procedimento cirúrgico, subtraiu-se o peso do cotonete encharcado com sangue do peso do cotonete seco. Um cotonete encharcado com sangue pesou 0,227 mg. Um mililitro de sangue equivale a aproximadamente 1,06 gramas (http://en.wikipedia.org/wiki/Blood_alcohol_content). Portanto, 0,227 mg foi equivalente a 0,240 mL de sangue. A reposição volêmica foi instituída com solução de cloreto de sódio 0,9% (Isofarma, CE, Brasil) e o volume repostado foi igual ao volume de sangue perdido, administrado IP ao final da cirurgia.

Os animais foram continuamente monitorados com ECG no transoperatório. O infarto do miocárdio foi considerado bem sucedido após identificação da elevação do segmento ST. O tubo orotraqueal foi removido após a estabilização da respiração espontânea e antes do animal ganhar consciência. A recuperação da anestesia transcorreu com os animais em uma caixa de madeira customizada com temperatura controlada por termostato, entre 37,5°C e 39°C. Depois, foram colocados em caixas individuais onde receberam ração e água *ad libitum*.

Analgesia com tramadol (Fort Dodge, Campinas), na dose de 4 mg/kg, foi administrada por via IP imediatamente após a cirurgia e em intervalos de seis horas, durante as 24 horas subsequentes. Atropina (Sintofarma, SP, Brasil) na dose de 1 mg/kg foi administrada por via subcutânea quando os animais apresentaram evidencia de secreção pulmonar na recuperação.

A cirurgia simulada (SHAM) consistiu do mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a ligadura da ACADE. As cirurgias cardíacas, bem como as avaliações eletrocardiográficas e da função cardíaca, foram realizadas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa.

4.3 Cultivo das CTMs, marcação com QTRACKER e infusão

4.3.1 Coleta e cultivo das CTMs

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* (n = 5) e estes 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.

Após a desarticulação e remoção dos fêmures de forma asséptica, as epífises distais foram seccionadas, 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 ressuspenso 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).

4.3.2 Caracterização das CTMs

Células na quarta passagem foram submetidas aos testes de diferenciação osteogênica e adipogênica. As células foram desprendidas das garrafas T-75cm² com tripsina-EDTA e plaqueadas em placas de 6 *wells* (TPP - Zollstrasse, Trasadingen,

Suíça) na concentração de 1×10^4 células/well. Para diferenciação osteogênica o meio DMEM com 10% de SFB foi enriquecido com 10^{-8} mol/mL de dexametasona (Sigma), $5\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma) e 10mmol/L de β -glicerofosfato (Sigma).

Para a diferenciação adipogênica o meio DMEM sem SFB foi enriquecido com 10^{-8} mol/mL de dexametasona (Sigma), 10^{-8}M de insulina recombinante humana, $200\mu\text{M}$ de indometacina cristalina e $500\mu\text{M}$ de isobutil-metilxantina. Os meios de diferenciação foram trocados a cada 3 dias por 28 dias. Após esse tempo, amostras das células foram fixadas por 1 hora em paraformaldeído a 4% e coradas pela técnica de Von Kossa + HE para detecção de depósitos de cálcio na matriz e Oil Red O para a detecção de vesículas de lipídeos intracelulares. Para cada teste de diferenciação foi cultivado um grupo controle das células em meio DMEM com 10%SFB. Os testes de diferenciação foram realizados em triplicata.

As células foram também 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.

A figura 2 demonstra a análise da citometria de fluxo para identificação das CMTs. Nessa perspectiva, as CTMs da quarta passagem foram submetidas à imunofenotipagem com os anticorpos anti-CD34, anti-CD45, anti-CD54, anti-CD90 e anti-HLA-DR (complexo de histocompatibilidade de classe II) e demonstraram expressão negativa para os marcadores de superfície CD34 (3,47%), CD45 (6,11%) e para HLA-DR (95,5%) e positiva para os marcadores CD54 (95,8%), e CD90 (99,0%) conforme ilustra a figura abaixo.

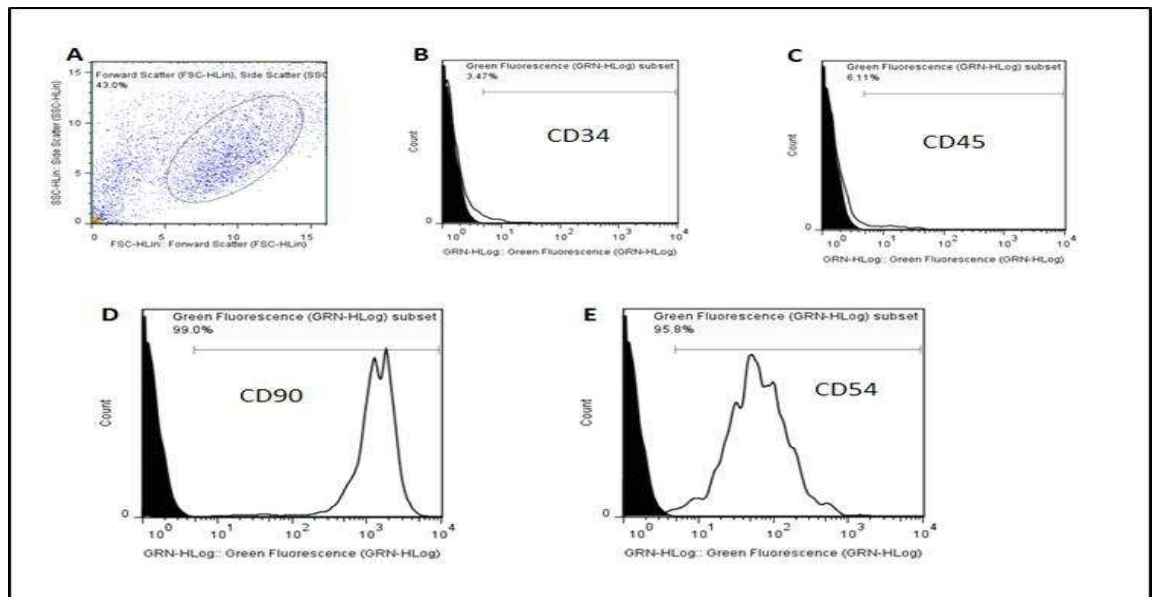


Figura 2: Avaliação da frequência de CD 34, CD 45, CD 90 e CD 54 por citometria de fluxo em células tronco mesenquimais oriundas da medula óssea de ratos Wistar. A intensidade de fluorescência de cada marcador de superfície nas CTM indiferenciadas (gráficos brancos ou abertos) está comparada com os isotipos 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).

Para serem consideradas CTMs, o tipo celular deve: primeiramente serem isoladas a partir de um nicho de células mononucleares com base na sua aderência apresentando morfologia fibroblastóide e aderência a placa de cultura como descrito por Pittenger et al. (1999). O segundo ponto é que as expressões de CD13, CD29, CD54, CD73, CD90, CD106 estejam presentes, e que CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79, ou CD19 e HLA-DR não sejam expressos em mais de 95% das células em cultura. Em terceiro e mais importante, é a capacidade de diferenciação *in vitro* em linhagens mesodermal: osso, cartilagem e tecido adiposo (Morrison et al., 1997; Nardi e Meirelles, 2006). A citometria de fluxo demonstrou expressão positiva dos marcadores celulares de superfície CD54 e CD90 e expressão negativa dos marcadores CD34 e

CD45. Em conjunto, todos os critérios para classificação de CTMs foram obtidos, comprovando assim que as células transplantadas foram mesmo CTMs.

4.3.3 Marcação e transplante das CTMs

Doze (12) horas antes do transplante, células da sexta passagem foram incubadas por 60 minutos, a 37°C, com marcador nanofluorescente Qtracker Cell Labeling 655® (Invitrogen, California, EUA), segundo recomendações do fabricante. As células marcadas foram tripsinizadas e centrifugadas a 22°C por 5 minutos em 1500 rpm para a obtenção do pellet celular. O pellet foi ressuscitado em PBS e alíquotas de 1×10^6 células foram preparadas em 1,0 mL de PBS e armazenadas em caixa de isolamento térmico até o momento da aplicação intravenosa. Uma dose foi preparada para avaliação a fresco em microscópio de fluorescência para comprovar a eficácia da nanomarcagem.

Com auxílio de cateter intravenoso 24G que foi inserido na veia lateral da cauda, a suspensão de $1,0 \times 10^6$ células/mL foi injetada numa janela terapêutica de 72 horas após o IM.

Em relação aos animais utilizados para a marcação com Q-tracker e verificação da presença das células no tecido alvo, CTMs derivadas da medula óssea foram isoladas do fêmur de ratos Wistar com 4 semanas de idade de quarta passagem foram marcadas com Q-tracker durante 45 minutos. Alíquotas celulares de 1 ml contendo 1×10^6 células, foram injetadas via veia lateral da cauda imediatamente após o IM. Os animais foram submetidos a eutanásia 18h após o infarto e fragmentos do coração, baço e pulmão foram coletados com o objetivo de rastrear o destino das CTM transplantadas. As amostras foram fixadas em formalina de Carlson por 24 horas. Transcorrido esse período, o material foi desidratado, diafanizado e incluído em parafina. Foram feitas secções transversais, de 5 µm de espessura, com intervalo de 50 µm 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-dimidino-2-phenylindole, Invitrogen, CA, USA). A imunofluorescência do Q-tracker 655® foi avaliada utilizando o filtro de excitação WG e para evidênciação do núcleo foi utilizado o filtro WU em microscópio de fluorescência (Olympus BX-60®, Tokyo, Japan). Foram capturadas cinco imagens por secção.

As células previamente marcadas incorporaram o marcador, evidenciado pela alta fluorescência dos nanocristais citoplasmáticos em vermelho, com filtro de excitação WG. As células marcadas foram encontradas nos pulmões dos animais 18 horas após o transplante. Não foram encontradas células Q-tracker positivas no coração nesse momento.

No presente estudo, as análises com o marcador Q-Tracker nas CTMs sugerem que esse tipo celular não foi encontrado no tecido do miocárdio, e sim no pulmão, talvez devido ao método de infusão adotado (infusão intravenosa via artéria caudal). Nessa perspectiva, alguns trabalhos investigaram se as CTs realmente alcançariam o órgão alvo através de uma administração intravenosa e concluíram que o pulmão é uma barreira às células tronco, que acaba reterendo a grande maioria dessas devido ao tamanho das células mesenquimais e à dificuldade de passar pelos capilares pulmonares (Schrepfer et al., 2007; Fischer et al., 2009). Nessa perspectiva, acredita-se que o pulmão tenha sido o órgão responsável por reter as células tronco e impedir a chegada destas ao miocárdio nos animais que sofreram o IM.

4.4 Protocolo de treinamento físico

4.4.1 Adaptação à esteira

Todos os ratos foram submetidos a um período de adaptação à esteira e ao protocolo de corrida caminhando diariamente à velocidade de 5 m/min, 5 min/dia e 0° de inclinação, durante 4 dias, sendo que no 5° dia os animais descansaram para o teste do tempo total de exercício até a fadiga (TTF) a ser realizado no 6° dia.

4.4.2 Exercício físico após o infarto do miocárdio

Vinte e quatro horas após indução do IM ou cirurgia simulada e infusão das CTMs, os animais dos grupos EX SHAM, EX IM e EX IM CT iniciaram o exercício físico. Em esteira rolante, com 0° de inclinação, os animais exercitaram na primeira semana durante 20 min/dia, à velocidade de 7-10m/min, durante 4 dias consecutivos

(segunda a quinta). No 5º dia os animais ficaram em repouso e no 6º dia foram submetidos ao teste do tempo de exercício total até a fadiga (TTF) inicial.

4.4.3 Avaliação da tolerância ao esforço físico

A tolerância ao esforço físico em todos os animais foi estimada por meio da capacidade máxima de esforço físico, avaliada em teste de exercício progressivo com protocolo escalonado antes e após o IM, a cirurgia simulada e a terapia com CTMs. A capacidade máxima de esforço foi quantificada pelo tempo total do teste até a fadiga em minutos (TTF, min). O teste foi realizado em uma esteira rolante elétrica (Insight Instrumentos – Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os animais iniciaram a corrida à velocidade de 5 m/min, 0º de inclinação, sendo que a velocidade da esteira foi aumentada em 3 m/min a cada 3 minutos até a fadiga (adaptado de Lacerda, 2006). A fadiga foi determinada quando o animal se recusava a continuar mesmo após estimulação manual, ou quando o animal se mostrava incapaz de manter o ritmo na esteira (Trueblood et al., 2005). A velocidade máxima de corrida (V) obtida neste teste foi utilizada para calcular a intensidade de corrida adotada no programa de treinamento (%VMC, m/min). A capacidade máxima de esforço físico foi avaliada 2 dias antes, 7 dias após o IM e a cada 4 semanas de treinamento físico para ajuste da velocidade de corrida dos animais, assim como ao final da décima segunda semana de treinamento físico.

4.4.4 Programa de treinamento físico

O programa de treinamento (Tabela 1) foi realizado em esteira rolante elétrica (Insight Instrumentos – Ribeirão Preto, SP, Brasil), a 0º de inclinação, 5 dias por semana (segunda a sexta-feira), 60 minutos por dia, durante 12 semanas. A duração da sessão de treinamento teve aumento progressivo até atingir os 60 minutos de treinamento no começo da segunda semana. A velocidade também teve aumento progressivo de modo que permanecesse em 60% da velocidade máxima de corrida (VMC). Esta intensidade foi reajustada a cada 4 semanas como já mencionado no item 3.4.4 (tabela 1) (adaptado de Hochman & Healy, 1986).

Os animais dos grupos não treinados em esteira rolante (SED SHAM, SED IM e SED IM CT) foram igualmente manuseados e colocados na esteira rolante 3 dias/semana, 10 min/dia, 0° de inclinação, à velocidade de 5 m/min. Quarenta e oito horas após o último teste de tolerância ao esforço (TTF final), no final da 12ª semana de treinamento, os animais foram submetidos à avaliação ecocardiográfica (item 3.5). O programa de treinamento foi realizado no Laboratório de Biologia do Exercício do Departamento de Educação Física da Universidade Federal de Viçosa.

Tabela 1: Protocolo de treinamento

Semanas	Duração	Intensidade
Primeira Semana: Adaptação à esteira	10'	5 m/min
Teste do Tempo Total de Exercício até a Fadiga		
Segunda Semana: Adaptação ao Treinamento		
Dia 1	20'	
Dia 2	30'	50%
Dia 3	40'	
Dia 4	50'	
Dia 5	Descanso	
Teste do Tempo Total de Exercício até a Fadiga		
Terceira Semana: Protocolo de treinamento	60'	50-60%
Quarta Semana: Protocolo de treinamento	60'	55-60%
Teste do Tempo Total de Exercício até a Fadiga		
Quinta a oitava semana: Protocolo de treinamento	60'	55-60%
Teste do Tempo Total de Exercício até a Fadiga		
Oitava a décima segunda semana: Protocolo de treinamento	60'	60%

4.5 Avaliação ECO-dopplercardiográfica (ECO)

4.5.1 Anestesia

Os animais foram anestesiados em câmara de indução com isoflurano 3% e oxigênio 100% em fluxo constante de 1 mL/minuto. Posteriormente, foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma caixa de polietileno para proceder-se o exame. Sob a caixa de polietileno foram colocadas bolsas aquecidas a de 37° para manutenção da temperatura corporal dos animais. O controle da temperatura corporal foi realizado constantemente para que esse parâmetro não afetasse a frequência cardíaca e os parâmetros hemodinâmicos.

A anestesia foi mantida com isofluorano diluído em oxigênio 100%, com concentração ajustada para manter um plano anestésico ideal para apenas imobilizar o animal.

4.5.2 Eco-Doppler cardiografia

As imagens para o estudo de ECO-Doppler cardiografia foram adquiridas de forma transtorácicas bi-dimensionais (2D) (*frame rate* de 60 a 120 fps), modo-M e Doppler espectral usando um sistema de ultrassom (MyLabTM30 – Esaote, Genova, Itália) e um transdutor de 11,0 MHz de frequência nominal e de acordo com as diretrizes da Sociedade Americana de Ecocardiografia. A coleta dos dados ocorreu no final do período experimental e durante a fase de coleta foi mantida a respiração espontânea dos animais.

Após armazenamento dos dados, procederam-se as análises das imagens de forma aleatória e com o observador cego quanto aos grupos experimentais. As imagens em modo-M e Doppler espectral foram gravadas com velocidade de varredura de aproximadamente 200 mm/s e ajustadas de acordo com a frequência cardíaca. Cada parâmetro foi analisado usando 5 ciclos cardíacos utilizando-se as melhores imagens obtidas.

A morfologia do VD foi avaliada tanto pelo espessamento da parede livre (RVFT) em sistóle e em diástole quanto pelo diâmetro do VD também em sistóle como em diástole (RVD). O RVFT foi avaliado a partir da imagem obtida do eixo curto paraesternal logo abaixo da valva tricúspide ou do eixo longo paraesternal em modo-M (dependendo da qualidade da imagem). O RVD foi mensurado a partir da distância máxima da parede livre do VD até o septo na vista apical das 4 câmaras (Mercer-Rosa et al., 2013).

A avaliação da função do VD foi baseada no encurtamento da base-para-ápice durante a sístole, mensurada a partir da excursão sistólica no plano anular da valva tricúspide (TAPSE) na porção lateral do plano anular da tricúspide. O ânulo lateral da valva tricúspide, a distância diastólica final e a distância sistólica final foram identificados e mensurados até um determinado ponto da tela o qual era sempre o mesmo tanto para a sístole quanto para a diástole. O sinal de ECG foi utilizado para padronizar as mensurações e assegurar que todas foram obtidas durante o mesmo período do ciclo cardíaco. Portanto, a distância que o ânulo desloca-se verticalmente deve ser a mesma independente se o ponto mensurado é o ápice do coração ou o ápice do setor (imagem) (Mercer-Rosa et al., 2013).

4.6 Peso do coração e dos ventrículos

Oito animais de cada grupo experimental foram utilizados para avaliação de cardiomiócitos isolados. Estes animais foram submetidos à eutanásia por decaptação (guilhotina EB 271, Insight, São Paulo, Brasil), tiveram o coração removido e lavado em solução contendo 750 μM de CaCl_2 para retirar o excesso de sangue, sendo pesado em balança de precisão (Gehaka – Brasil, modelo AG 200). Durante o processo de isolamento (item 3.7), após a perfusão das soluções de isolamento, os ventrículos (direito e esquerdo) foram separados dos átrios e pesados, juntamente com o septo interventricular. Os índices de hipertrofia cardíaca e ventricular foram calculados pelas razões dos pesos do coração e dos ventrículos, respectivamente, pela massa corporal dos animais.

4.7 Avaliação histológica para medida do tamanho do infarto

Oito animais de cada grupo experimental foram utilizados para a avaliação histológica. Os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico e os corações foram perfundidos com solução de KCl 14 mM, removidos e processados para avaliação histológica (medida do tamanho do infarto). Após esse procedimento, os átrios foram separados e os ventrículos foram cortados transversalmente em 3 secções e o anel mediano (aproximadamente 3mm) foi fixado em formalina de Carson 10% (por 48 horas), desidratados em bateria crescente de álcool, 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 VE 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 VE (CENVE); circunferência epicárdica do VE (CEPVE). O tamanho do infarto foi expresso como percentual e calculado usando-se a fórmula de Mulder et al, (2002): $(CCEN + CCEP / CENVE + CEPVE) \times 100$.

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

4.8 Conteúdo de água nos pulmões

Para determinar se os ratos com IM desenvolveram insuficiência cardíaca congestiva (ICC), foi avaliado o teor de água no pulmão. O conteúdo hídrico dos órgãos foi obtido a partir dos seus pesos úmidos e secos. O peso úmido foi obtido em balança de alta precisão, logo após a remoção do órgão da cavidade torácica e dissecação dos tecidos anexos. Esses pulmões foram identificados, levados para uma estufa (MA035, Marconi Equipamentos, SP, Brasil) para desidratação a 80°C por 12 horas e novamente

pesados (conforme Yeğinsu, 2010). Obtidos os pesos secos do pulmão, o teor de água (%H₂O) foi definido pela equação: % H₂O= (P úmido – P seco)/ P úmido x 100, conforme descrito por Portes e Tucci (2006).

4.9 Contratilidade celular

4.9.1 Isolamento dos cardiomiócitos

Após a eutanásia, as cartilagens costocodrais foram abertas em ambos os lados e o esterno rebatido para cima. Após a exposição da cavidade torácica, a veia cava inferior e superior, as artérias aorta e pulmonar, a traquéia, o esôfago e parte dos pulmões foram seccionados sucessivamente até a remoção em bloco do coração. Logo após a remoção, o coração foi colocado em um béquer contendo uma solução nutritiva (solução A, item 4.9.2). Após estes procedimentos, o coração foi transferido para uma placa de vidro, a artéria aorta ascendente foi seccionada com uma tesoura de microcirurgia na altura de sua segunda ramificação (tronco braquicefálico), fixada com um fio de sutura em uma agulha de aço inoxidável modificada (cânula), e acoplada a uma seringa de 1 mL que foi fixada a um sistema de *Langendorff* caseiro (37°C), com controle manual da perfusão por gravidade usando-se uma torneira.

Para o isolamento dos cardiomiócitos, o coração foi perfundido com uma solução de isolamento, contendo 750 µM de CaCl₂ (solução A, item 4.9.2), em um fluxo constante, até que os vasos coronários estivessem limpos de sangue. Em seguida, trocou-se a perfusão para uma solução livre de cálcio, contendo 0,1 mM de *EGTA* (solução B, item 4.9.2), durante 6 min, para destruição das bandas escalariformes entre os cardiomiócitos. Em seguida, o coração foi perfundido com uma solução contendo 30 mg.mL de colagenase tipo 2 e 3 mg.mL de protease e 100 µM de CaCl₂ (solução C, item 4.9), durante 20 min, para a destruição das fibras colágenas extracelulares. Todas as soluções utilizadas no procedimento de isolamento foram oxigenadas (O₂ 100%) e mantidas a 37°C. Ao final da perfusão os ventrículos foram separados dos átrios e pesados. O ventrículo direito foi removido e cortado em pequenos fragmentos. Logo após, os fragmentos foram colocados em frascos contendo 5 ml da solução enzimática (solução D item 4.9.2).

Os frascos foram agitados moderadamente durante 5 min, em “banho-maria” a 37°C, sendo o tecido cardíaco oxigenado (O₂ 100%). A seguir, o conteúdo dos frascos foi filtrado e centrifugado (3000 rpm) por 30s. O sobrenadante foi removido e as células foram suspensas na solução 750 µM de CaCl₂ (solução A item 4.9.2). Em seguida, as células foram armazenadas em placas de petri a 5°C, até serem utilizadas. Durante os experimentos com cardiomiócitos isolados, somente as células tolerantes ao Ca²⁺, quiescentes e apresentando formato e estrias transversais bem definidas foram utilizadas e os registros foram sempre feitos entre uma e seis horas após o isolamento.

4.9.2 Soluções de isolamento

As soluções utilizadas para o isolamento dos cardiomiócitos ventriculares foram feitas usando-se uma solução básica com água deionizada ultrapura (milli-Q) e a seguinte composição (em mM): NaCl (130) – 7,6 g/L; MgCl₂ (1,43) – 0,28 g/L; KCl (5,4) – 0,4 g/L; (HEPES) (5) – 0,062 g/L; glicose (10) – 1,8 g/L; taurina (20) – 2,38 g/L; creatina (10) – 1,3 g/L; pH = 7,3; temperatura ambiente.

Solução B: Para a solução de isolamento contendo Ca²⁺, foram adicionados 375 µL de CaCl₂ (1 M) em 500 mL da solução básica.

Solução C: Para a solução de isolamento livre de Ca²⁺, foram adicionados 200 µL de EGTA (100 mM) em 250 ml da solução básica.

Solução D: Para a solução enzimática de isolamento, foram adicionados 0,030 g de colagenase e 0,003g de protease em 30 mL da solução básica.

4.9.3 Solução tampão HEPES

Durante a análise da mecânica de contração, os miócitos cardíacos foram banhados com a solução de perfusão tampão HEPES contendo (em mM): solução estoque: NaCl (113) – 65,99 g/L; HEPES (5) – 11,9 g/L; NaH₂PO₄ (1) – 1,42 g/L; MgSO₄ (1) – 2,46 g/L; KCl (5) – 3,72 g/L; solução sopa: Na acetato (20) – 16,4 g/100 ml; glicose (10) – 18,1 g/100mL; insulina (5 u/L) – 0,5 g/100 mL. Para fazer um litro desta solução, foram adicionados 100 ml da solução estoque, 10 ml da solução sopa e 1

ml de CaCl₂ (1) em água mili-Q. Esta solução foi equilibrada para um pH=7,4 e mantida em temperatura ambiente.

4.9.4 Mensuração de contração

As contrações celulares foram medidas por meio da técnica de alteração do comprimento dos cardiomiócitos utilizando o sistema de detecção de bordas (Ionoptix, EUA) montado num microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, EUA) equipado com uma lente de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, EUA), conforme previamente descrito (Natali *et al.*, 2001). Em resumo, os cardiomiócitos foram acomodados em uma câmara experimental giratória com a base de vidro e banhados pela solução de perfusão tampão (solução tampão *HEPES*) à temperatura ambiente (25 °C). Os miócitos cardíacos foram então visualizados em um monitor através de uma câmera (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada ao microscópio invertido, utilizando um programa de detecção de imagens (Ionwizard, Ionoptix, EUA) com uma frequência de 240 Hz.

As células cardíacas foram estimuladas à frequência de 1Hz (40 Volts, duração de 5 ms) utilizando 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 e as contrações dos cardiomiócitos após a estimulação elétrica foram capturadas pelo sistema de detecção de bordas (Ionwizard, Ionoptix, EUA) e armazenadas para análise posterior (Figura 3).

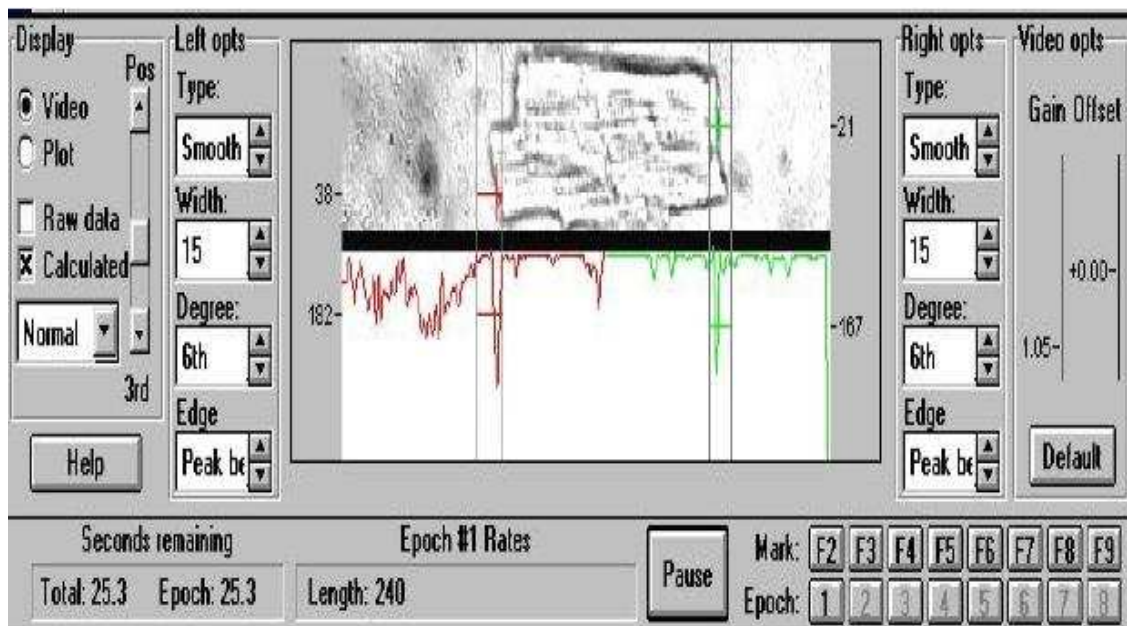


Figura 3: Representação do programa utilizado para aquisição das imagens e dos registros das contrações dos cardiomiócitos isolados. A definição das bordas direita e esquerda é projetada através dos picos verde e vermelho, respectivamente.

Foram utilizados somente os cardiomiócitos que apresentavam boas condições, ou seja, as bordas (direita e esquerda) e as estriações sarcoméricas bem definidas, relaxados em repouso, sem apresentar contrações espontâneas. Os registros foram sempre realizados até três horas após o isolamento dos cardiomiócitos.

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 comparados com um limiar. Esse limiar foi três vezes o desvio-padrão da série, ou seja, 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 a amplitude máxima de contração, ms), 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 principais parâmetros avaliados são demonstrados na Figura 4. Durante cada dia de experimento, foram analisados cardiomiócitos isolados de animais de um determinado grupo experimental e do seu respectivo grupo controle.

As imagens das células também foram utilizadas para determinar o comprimento e a largura celular, que foram usadas para o cálculo do volume celular (Sato et al., 1996) e a razão comprimento pela largura.

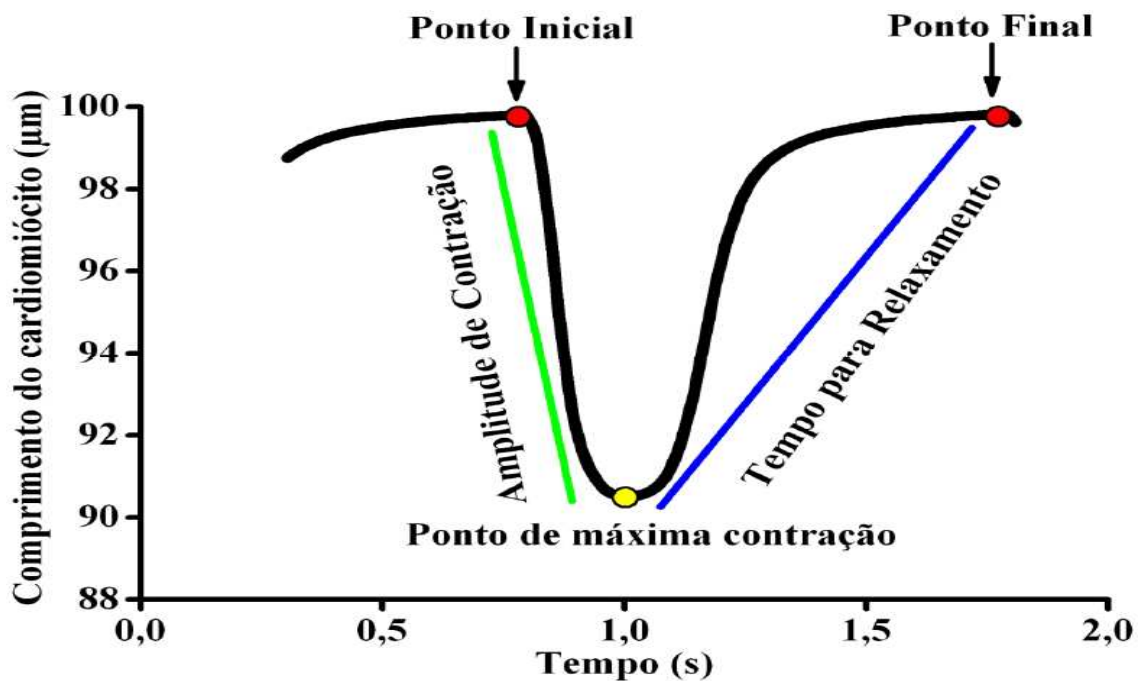


Figura 4: Traçado representativo de uma contração celular estimulada na frequência de 1 Hz, e os parâmetros avaliados.

4.10 Medida e análise do transiente de $[Ca^{2+}]_i$

As medidas do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ dos cardiomiócitos isolados do VD 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-ester (Fluo-4 AM, Molecular Probes, Eugene, EUA), conforme descrito por Prímola-Gomes et al. (2009).

O Fluo-4 AM (5 μM) foi preparado em uma solução de estoque a base de dimetilsulfóxido – DMSO (30 μl de DMSO em 50 μg de Fluo-4 AM). Adicionou-se 5 μl dessa solução de Fluo-4 AM/DMSO em 495 μl de meio celular, durante 20 min à temperatura ambiente. Após esse procedimento, os cardiomiócitos foram lavados e suspensos em solução tampão HEPES (item 4.9.3) para remover o excesso da sonda fluorescente, acomodados em uma câmara experimental giratória com a base de vidro e banhados pela solução de perfusão tampão HEPES (item 4.9.3) à temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). Quando esta sonda está ligada ao Ca^{2+} e é excitada com o comprimento de onda de 488 nm, emite um sinal de fluorescência medido a 510 nm, que se relaciona às variações sarcoplasmáticas de Ca^{2+} . Tais variações foram expressas em relação à razão: F/F_0 . Nas medidas dos transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, F representa a média da fluorescência máxima após os estímulos, na fase sistólica do transiente, e F_0 representa a média da fluorescência mínima medida entre as contrações celulares, na fase diastólica do transiente.

Os transientes de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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 1 Hz 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 núcleos. As varreduras foram feitas por meio de um laser de argônio (488 nm). As varreduras foram repetidas a cada 1,54 ms, sendo utilizadas para a criação de imagens bidimensionais (tempo no eixo x e fluorescência no eixo y) (Figura 5).

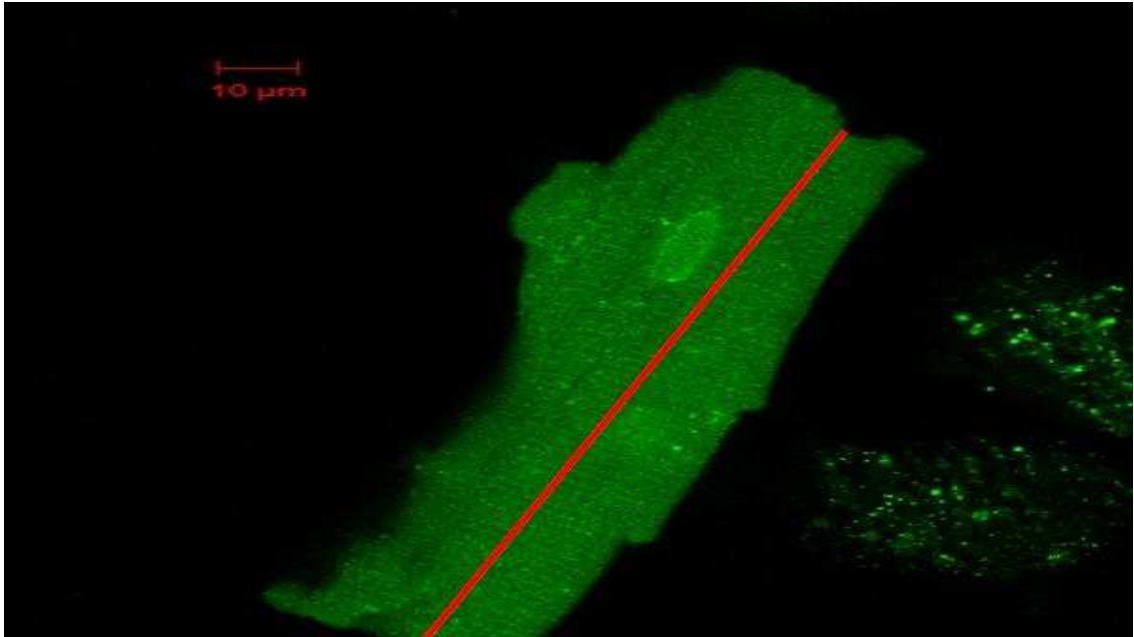


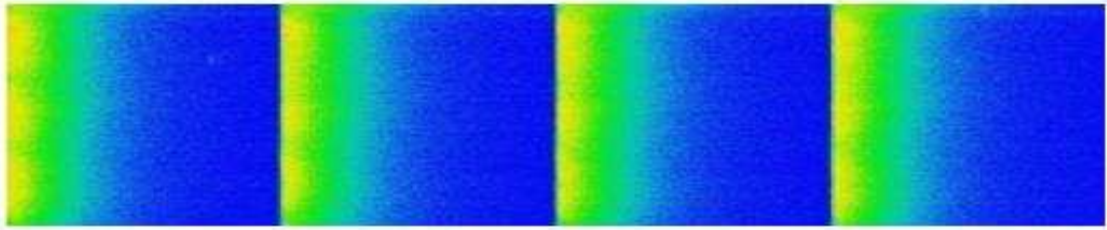
Figura 5: Cardiomiócito isolado incubado com o indicador fluorescente de Ca^{2+} (Fluo-4 AM). A linha de varredura (vermelha) foi posicionada no eixo longitudinal da célula, com o cuidado de não cruzar regiões de núcleos.

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 na temperatura ambiente (~ 25 °C).

As imagens obtidas foram processadas através de um software desenvolvido em plataforma MatLab®, pelo professor do curso de Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Viçosa, Dr. Leonardo Bonato Félix. As variáveis analisadas foram: amplitude do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (F/F_0); tempo para o pico do 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 a metade do retorno à fluorescência basal, ms).

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

A)



B)

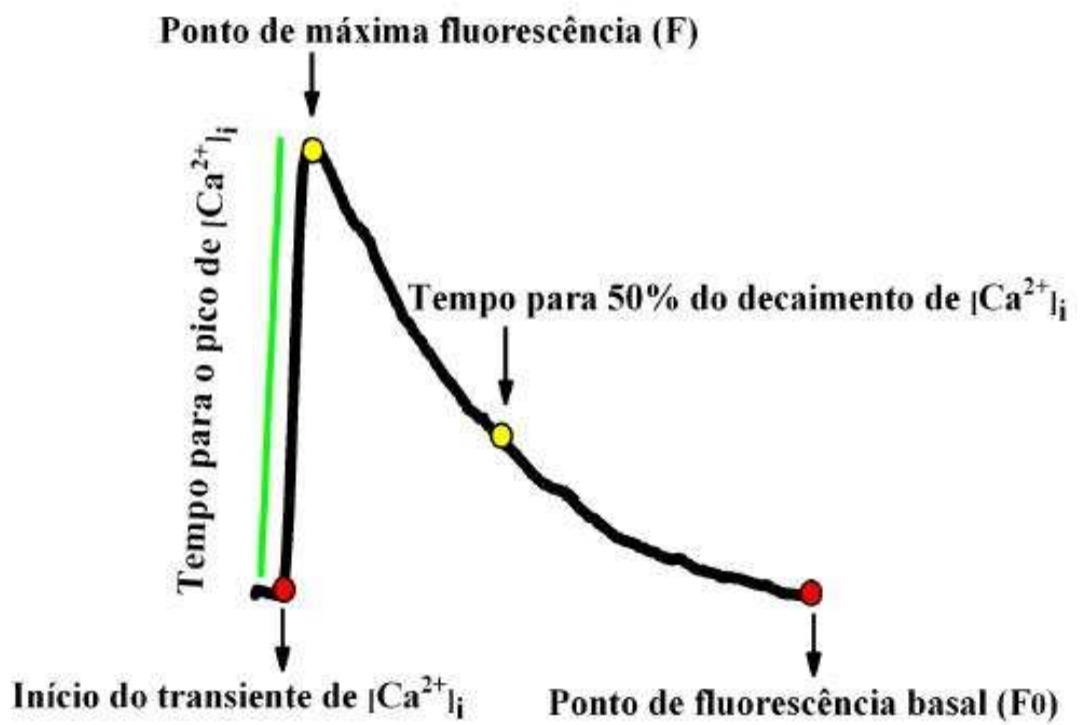


Figura 6. A) Traçados representativos das imagens de fluorescência para o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em cardiomiócitos isolados de ratos. B) Resultado da análise da imagem do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ e os parâmetros avaliados

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para comparação do peso inicial e peso final dos animais no presente estudo, foi utilizado o teste t de Student pareado. Para a comparação do tamanho do infarto foi utilizada a ANOVA two-way, seguida do post hoc de Holm Sidak. Para as comparações das demais variáveis entre os seis grupos experimentais utilizou-se a análise fatorial 2 (sedentário vs exercitado) por 3 (Infarto vs Sham vs Terapia celular), seguida do teste *post-hoc* de Holm Sidak.

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Foi utilizado o programa estatístico *SigmaPlot*, v.11.0. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Eficiência do treinamento

Em relação ao TTF, não foi verificado efeito do fator infarto ($p > 0,05$), independente dos fatores exercício e terapia celular. O fator exercício promoveu um aumento ($p < 0,05$) no tempo de corrida dos animais, independentemente dos fatores infarto e terapia celular (Sedentários = $11,44 \pm 0,85$ min vs Exercitados = $22,83 \pm 0,85$ min). Não foi verificado efeito do fator terapia celular ($p > 0,05$), de maneira independente dos fatores infarto e exercício. Não houve interação entre os fatores ($p > 0,05$).

No painel A da figura 7 estão representados os valores do TTF. Pode-se observar que todos os grupos que realizaram treinamento físico aumentaram o TTF após 12 semanas, quando comparados aos seus respectivos grupos controles.

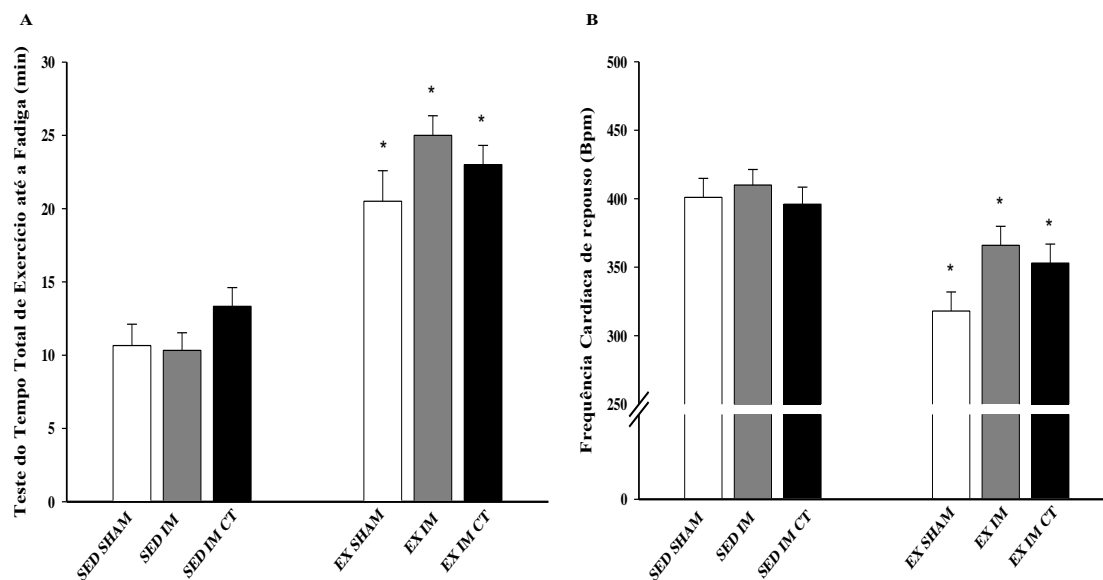


Figura 7: (A) Teste do tempo total de exercício até a fadiga dos animais experimentais após o período de treinamento de corrida aeróbico (minutos) de 13 animais por grupo; (B) Frequência cardíaca de repouso (batimentos por minuto) de 6 animais por grupo. Os grupos de tratamento são: SED SHAM: grupo de sedentários que foram submetidos à cirurgia simulada; SED IM: grupo de sedentários e infartados; SED IM CT: grupo de

sedentários e infartados que foram submetidos à terapia com CTMs; EX SHAM: grupo de exercitados que foram submetidos a cirurgia simulada; EX IM: grupo de exercitados e infartados; EX IM CT: grupo de exercitados e infartados que foram submetidos à terapia com CTMs. Dados são expressos como média \pm EPM. *, estatisticamente diferente ($p < 0,05$) dos respectivos grupos controles. Teste estatístico: Análise fatorial 2 x 3 com *post hoc* de *Holm-Sidak*.

Em relação à FC de repouso, não foi verificado efeitos do fator infarto ($p > 0,05$), independentemente dos fatores exercício e terapia celular. Foi observado efeito do fator exercício ($p < 0,05$), de forma independente dos fatores infarto e terapia celular (Sedentários = 402 ± 7 bpm vs Exercitados = 346 ± 8 bpm). Não ocorreu nenhum efeito do fator terapia celular, independentemente dos fatores exercício e infarto ($p > 0,05$). Não houve interação entre os fatores ($p > 0,05$).

Na FC de repouso (Fig. 7-B), fica evidente que o protocolo de treinamento aeróbico aplicado foi eficaz em induzir uma redução dos batimentos cardíacos, visto que reduziu a frequência cardíaca dos animais treinados quando comparados ao seu grupo controle sedentário.

6.2 Peso corporal, pesos absolutos e relativos do coração e ventrículos, tamanho do infarto e conteúdo de água do pulmão

Observa-se na tabela 2, em relação ao peso corporal, que todos os grupos de animais aumentaram o peso corporal ao final do experimento quando comparado ao peso inicial ($p < 0,05$).

O fator infarto promoveu aumento ($p \leq 0,05$) no peso do coração de maneira independente dos fatores exercício e terapia celular (Infartados = $1,76 \pm 0,06$ g vs Não infartados = $1,48 \pm 0,06$ g). Não foi encontrado efeito do fator exercício sobre o peso do coração ($p > 0,05$) independentemente dos fatores infarto e terapia celular. O fator terapia celular promoveu aumento ($p < 0,05$) nesse parâmetro independentemente dos fatores exercício e infarto (Tratados = $1,83 \pm 0,06$ g vs Não tratados = $1,48 \pm 0,06$ g). Não houveram interações entre os fatores ($p > 0,05$). Assim, foi observado um aumento no grupo SED IM em relação ao SED SHAM ($p < 0,05$). A terapia celular aumentou o peso dessa variável comparado ao SED SHAM ($p < 0,05$), no entanto não teve efeito ($p > 0,05$) sobre o IAM (SED IM CT = SED IM). Não foram verificados efeitos do treinamento (EX IM vs SED IM) ou ainda da associação dos tratamentos (EX IM CT = EX IM = SED IM CT) ($p > 0,05$).

Em relação ao peso dos ventrículos, o fator infarto promoveu aumento ($p < 0,05$) independentemente dos fatores exercício e terapia celular (Infartados = $2,45 \pm 0,11$ g vs Não infartados = $1,85 \pm 0,11$ g). Não foi encontrado efeito do fator exercício sobre o peso do coração ($p > 0,05$) independente dos fatores infarto e terapia celular. Já o fator terapia celular promoveu aumento ($p < 0,05$) nesse parâmetro de maneira independente dos fatores exercício e infarto (Tratados = $2,43 \pm 0,11$ g vs Não tratados = $1,85 \pm 0,11$ g). Não foram verificadas interações entre os fatores ($p > 0,05$). O grupo SED IM aumentou o peso dos ventrículos comparado ao SED SHAM ($p < 0,05$). Não foi encontrado efeito do treinamento ($p > 0,05$). A terapia celular (SED IM CT) aumentou o peso dessa variável comparado ao SED SHAM ($p < 0,05$) e sem efeitos ($p > 0,05$) sobre o IM (vs SED IM). Não foi verificado ($p > 0,05$) efeito da associação das terapias exercício e infarto (EX IM CT = EX IM = SED IM CT)

Foi observado aumento ($p < 0,05$) ocasionado pelo fator infarto na razão peso do coração pelo peso corporal independente dos fatores exercício e terapia celular

(Infartados = $4,46 \pm 0,15$ g vs Não infartados = $3,74 \pm 0,15$ g). Não foi verificado efeito do fator exercício sobre o peso do coração ($p > 0,05$) independentemente dos fatores infarto e terapia celular. Foi encontrado efeito do fator terapia celular ($p < 0,05$) de forma independente dos fatores exercício e infarto (Tratados = $4,55 \pm 0,15$ g vs Não tratados = $3,74 \pm 0,15$ g). Não foram encontradas interações entre os fatores ($p > 0,05$). Não foi verificada diferença entre os grupos SED IM e SED SHAM ($p > 0,05$). No entanto, o grupo SED IM CT apresentou maior relação quando comparado ao SED SHAM ($p > 0,05$) e sem efeitos ($p > 0,05$) quando comparado ao grupo SED IM. Não foi verificado efeito do exercício sobre o infarto (EX IM vs SED IM). Contudo, o exercício aumentou essa variável no grupo EX IM e EX IM CT vs EX SHAM ($p < 0,05$). Não foram observadas influências das associações terapêuticas (EX IM CT = EX IM = SED IM CT) ($p > 0,05$).

O fator infarto promoveu aumento ($p < 0,05$) na razão peso dos ventrículos pelo peso corporal de maneira independente dos fatores exercício e terapia celular (Infartados = $6,28 \pm 0,29$ g vs Não infartados = $4,64 \pm 0,30$ g). Não foi encontrado efeito do fator exercício sobre o peso do coração ($p > 0,05$) independentemente dos fatores infarto e terapia celular. O fator terapia celular promoveu aumento ($p < 0,05$) nesse parâmetro independentemente dos fatores exercício e infarto (Tratados = $5,99 \pm 0,29$ g vs Não tratados = $4,64 \pm 0,30$ g). Não houveram interações entre os fatores ($p > 0,05$). O grupo SED IM apresentou maior razão do peso dos ventrículos pelo peso corporal em comparação com o grupo SED SHAM ($p < 0,05$). Não foi verificado efeito ($p > 0,05$) do exercício na comparação EX IM vs SED IM. O exercício aumentou essa variável no grupo EX IM e EX IM CT vs EX SHAM ($p < 0,05$). Não foi verificado efeito da terapia celular (SED IM CT vs SED IM) ou ainda da associação dos tratamentos (EX IM CT = EX IM = EX IM CT) para um $p > 0,05$.

Não foi observada influência dos fatores infarto, exercício ou terapia celular sobre o peso do VD bem como não houve interações entre os fatores ($p > 0,05$).

No que tange a razão peso do VD pelo peso corporal, o fator infarto promoveu aumento ($p < 0,05$) independentemente dos fatores exercício e terapia celular (Infartados = $1,19 \pm 0,07$ g vs Não infartados = $0,91 \pm 0,07$ g). Não foi encontrado efeito do fator exercício independentemente dos fatores infarto e terapia celular e nem do fator terapia celular de maneira independente dos fatores exercício e infarto ($p > 0,05$). Não

foram verificadas interações entre os fatores ($p > 0,05$). Foi encontrado somente aumento no grupo EX IM vs EX SHAM ($p < 0,05$). Não foram encontradas alterações em relação aos efeitos do IM (SED IM = SED SHAM), efeito da terapia com CTMs (SED IM CT = SED IM), efeito do protocolo de treinamento adotado (EX IM vs SED IM) ou mesmo da associação das terapias (EX IM CT = EX IM = SED IM CT) ($p > 0,05$).

O protocolo de treinamento utilizado no grupo EX IM ($21,33 \pm 2,55\%$) ocasionou menor área infartada ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo SED IM ($30,40 \pm 2,32\%$). Foi observada redução no percentual do tamanho do infarto ($p < 0,05$) no grupo SED IM CT ($15,00 \pm 2,76\%$) quando comparado ao SED IM ($30,40 \pm 2,32\%$). Não foi encontrado efeito ($p > 0,05$) associado do exercício com as CTMs no grupo EX IM CT na redução do percentual da área infartada (EX IM CT = SED IM CT = EX IM).

O conteúdo de água no pulmão é um indicativo de congestão pulmonar e indicativo da insuficiência da bomba cardíaca. Não houve efeito do infarto nessa variável. Os tratamentos aplicados, exercício e terapia celular, também não foram capazes de modificar o percentual de água no pulmão ($p > 0,05$).

Tabela 2: Peso corporal inicial e final, peso do coração, peso dos ventrículos, peso do ventrículo direito, seus respectivos pesos relativos, tamanho do infarto e conteúdo de água dos pulmões.

	SED SHAM (n = 6)	SED IM (n = 6)	SED IM CT (n = 6)	EX SHAM (n = 6)	EX IM (n = 6)	EX IM CT (n = 6)
PC Inicial (g)	140 ± 3,45	148 ± 5,16	148 ± 3,29	146 ± 4,05	150 ± 6,14	143 ± 4,39
PC Final (g)	387 ± 12,3 [#]	422 ± 8,36 [#]	419 ± 10,03 [#]	406 ± 11,48 [#]	396 ± 20,50 [#]	396 ± 14,02 [#]
Peso Cor (g)	1,45 ± 0,08	1,81 ± 0,07 [*]	1,91 ± 0,08 [*]	1,50 ± 0,08	1,70 ± 0,09	1,76 ± 0,08
PV (g)	1,78 ± 0,16	2,54 ± 0,15 [*]	2,40 ± 0,16 [*]	1,92 ± 0,17	2,37 ± 0,17	2,46 ± 0,16
Peso Cor/PC (mg/g)	3,77 ± 0,21	4,30 ± 0,20	4,64 ± 0,21 [*]	3,70 ± 0,23	4,62 ± 0,23 [§]	4,46 ± 0,21 [§]
PV/PC (mg/g)	4,61 ± 0,41	6,04 ± 0,38 [*]	5,79 ± 0,41	4,68 ± 0,44	6,52 ± 0,44 [§]	6,20 ± 0,41 [§]
PVD (g)	0,38 ± 0,04	0,46 ± 0,04	0,42 ± 0,04	0,35 ± 0,05	0,47 ± 0,05	0,41 ± 0,04
PVD/PC (mg/g)/1000	0,97 ± 0,10	1,09 ± 0,10	1,00 ± 0,10	0,85 ± 0,11	1,29 ± 0,11 [§]	1,04 ± 0,10
Tamanho do IM (%)	-	30,40 ± 2,32	15,00 ± 2,76 ^{&}	-	21,33 ± 2,55 ^{&}	23,82 ± 2,32
Peso dos Pulmões (% de H ₂ O)	76 ± 1,16	77 ± 1,16	76 ± 1,16	76 ± 1,16	77 ± 1,16	76 ± 1,16

Os dados são expressos como média ± EPM de 6 animais por grupo experimental. Os grupos de tratamento são: SED SHAM: grupo de sedentários que foram submetidos à cirurgia simulada; SED IM: grupo de sedentários e infartados; SED IM CT: grupo de sedentários e

infartados que foram submetidos à terapia com CTMs; EX SHAM: grupo de exercitados que foram submetidos à cirurgia simulada; EX IM: grupo de exercitados e infartados; EX IM CT: grupo de exercitados e infartados que foram submetidos à terapia com CTMs. PC Inicial: Peso Corporal Inicial, PC Final: Peso Corporal Final, P Cor: Peso do coração; 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, IM: Infarto Agudo do Miocárdio. #, estatisticamente diferente do PC inicial; *, estatisticamente diferente do grupo SED SHAM; §, estatisticamente diferente ($p \leq 0,05$) do grupo EX SHAM; &, estatisticamente diferente do grupo SED IM. Teste estatístico: Análise fatorial 2 x 3 com *post hoc* de *Holm-Sidak*.

6.3 Ecocardiografia

Os dados relativos à ecocardiografia são apresentados na tabela 3 que demonstra os valores para a *excursão* sistólica do *plano anular da tricúspide* (TAPSE), diâmetro ventricular direito em diástole (RVDd); diâmetro ventricular direito em sístole (RVDs), espessura da parede livre do ventrículo direito em diástole (RVFTd), espessura da parede livre do ventrículo direito em sístole (RVFTs).

O fator infarto reduziu a TAPSE ($p < 0,05$), independente dos fatores exercício e terapia celular (Não Infartados = $1,55 \pm 0,14$ cm vs Infartados = $0,99 \pm 0,12$ cm). O fator exercício aumentou a TAPSE ($p < 0,05$), de maneira independente dos fatores infarto e terapia celular (Sedentários = $1,1 \pm 0,11$ cm vs Treinados = $1,59 \pm 0,11$ cm). O fator terapia celular aumentou a TAPSE ($p < 0,05$), independentemente dos fatores infarto e exercício (Tratados = $1,44 \pm 0,13$ cm vs Não Tratados = $0,99 \pm 0,12$ cm). Todavia, não houve interação entre os fatores ($p > 0,05$).

Assim, foi observada uma diminuição ($p < 0,05$) na função do VD (TAPSE) no SED IM em relação ao seu controle SED SHAM. Os dados demonstram efeito benéfico do treinamento, visto que a TAPSE aumentou ($p < 0,05$) no grupo EX IM, em comparação ao grupo SED IM. O grupo SED IM CT apresentou valor maior ($p < 0,05$) para a TAPSE do que o grupo SED IM, evidenciando, assim, o efeito da terapia com CTMs na melhora da função do VD. Não foi encontrado nenhum efeito da terapia celular em associação com o exercício no grupo EX IM CT, quando comparado ao grupo EX IM ou SED IM CT ($p > 0,05$).

Nos demais parâmetros não foram evidenciados efeitos dos fatores (infarto, exercício ou terapia celular, $p > 0,05$), bem de interação entre os tratamentos.

Tabela 3: Dados ecocardiográficos referentes ao ventrículo direito.

	SED SHAM (n = 6)	SED IM (n = 6)	SED IM CT (n = 6)	EX SHAM (n = 6)	EX IM (n = 6)	EX IM CT (n = 6)
TAPSE (cm)	1,40 ± 0,21	0,54 ± 0,16*	1,28 ± 0,17#	1,70 ± 0,19	1,47 ± 0,17#	1,60 ± 0,19
RVDd (cm)	1,60 ± 0,21	1,71 ± 0,19	1,58 ± 0,21	1,65 ± 0,21	2,43 ± 0,23	1,68 ± 0,21
RVDs (cm)	1,40 ± 0,26	1,68 ± 0,24	1,50 ± 0,26	1,63 ± 0,26	1,83 ± 0,29	1,35 ± 0,26
RVFTd (cm)	1,50 ± 0,15	1,37 ± 0,13	1,50 ± 0,26	0,87 ± 0,15*	1,12 ± 0,16	1,13 ± 0,15
RVFTs (cm)	1,68 ± 0,20	1,52 ± 0,18	1,41 ± 0,20	1,30 ± 0,20	1,29 ± 0,22	1,50 ± 0,20

Os dados são expressos como média ± EPM de 5 a 7 animais por grupo experimental. Os grupos de tratamento são: SED SHAM: grupo de sedentários que foram submetidos à cirurgia simulada; SED IM: grupo de sedentários e infartados; SED IM CT: grupo de sedentários e infartados que foram submetidos à terapia com CTMs; EX SHAM: grupo de exercitados que foram submetidos a cirurgia simulada; EX IM: grupo de exercitados e infartados; EX IM CT: grupo de exercitados e infartados que foram submetidos à terapia com CTMs. TAPSE: excursão sistólica através do plano anular da tricúspide; RVDd: diâmetro da parede do ventrículo direito em diástole; RVDs: diâmetro da parede do ventrículo direito em sístole; RVFTd: espessura da parede livre do ventrículo direito em diástole; RVFTs: espessura da parede livre do ventrículo direito em sístole. *, estatisticamente diferente do grupo SED SHAM; #, estatisticamente diferente do grupo SED IM. Teste estatístico: Análise fatorial 2 x 3 com *post hoc* de *Holm-Sidak*.

6.4 Morfologia dos cardiomiócitos

A tabela 4 mostra os valores referentes à morfologia dos cardiomiócitos do VD. Em relação ao comprimento dos cardiomiócitos, não houve efeito ($p > 0,05$) do fator infarto, independente dos fatores exercício e terapia celular. Não foi observado nenhum efeito ($p > 0,05$) do fator exercício, independente dos fatores IM e terapia celular. Além disso, não houve ($p > 0,05$) efeito do fator terapia celular, independente dos fatores IM e exercício. Assim, não houve interação ($p > 0,05$) entre os fatores e não foram detectados efeitos da associação dos tratamentos exercício e terapia celular ($p > 0,05$).

No que concerne a largura dos cardiomiócitos, não houve efeito ($p > 0,05$) do fator infarto, independente dos fatores exercício e terapia celular. Não foi observado nenhum efeito ($p > 0,05$) do fator exercício, independente dos fatores IM e terapia celular. Da mesma forma, não foi verificado efeito ($p > 0,05$) do fator terapia celular, independente dos fatores IM e exercício. Não houve interação entre os fatores ($p > 0,05$) e não foram observados efeitos da associação dos tratamentos exercício e terapia celular ($p > 0,05$).

Não foi verificado efeito do fator infarto ($p > 0,05$) na razão comprimento/largura, independente os fatores exercício e da terapia celular. Não foi observado efeito ($p > 0,05$) do fator exercício nesta razão, independentemente dos fatores IM ou da terapia com CTMs. Ainda, não foram detectados efeitos ($p > 0,05$) do fator terapia celular, independentemente dos fatores IM e exercício. Assim, não houve interação entre os fatores ($p > 0,05$) e não foram observados efeitos da associação dos tratamentos exercício e terapia celular ($p > 0,05$).

Não houve efeito do fator infarto no volume dos cardiomiócitos, independente dos fatores exercício e terapia celular ($p > 0,05$). Ainda, não foi detectado nenhum efeito do fator exercício, independente dos fatores IM e a terapia com CT ($p > 0,05$). Por fim, não houve efeito ($p > 0,05$) do fator terapia celular, independente dos fatores IM e exercício, bem como não foi detectados interação entre os fatores ($p > 0,05$). Não houve interação entre os fatores e não foram observados efeitos da associação dos tratamentos exercício e terapia celular ($p > 0,05$).

Tabela 4: Morfologia dos cardiomiócitos do ventrículo direito.

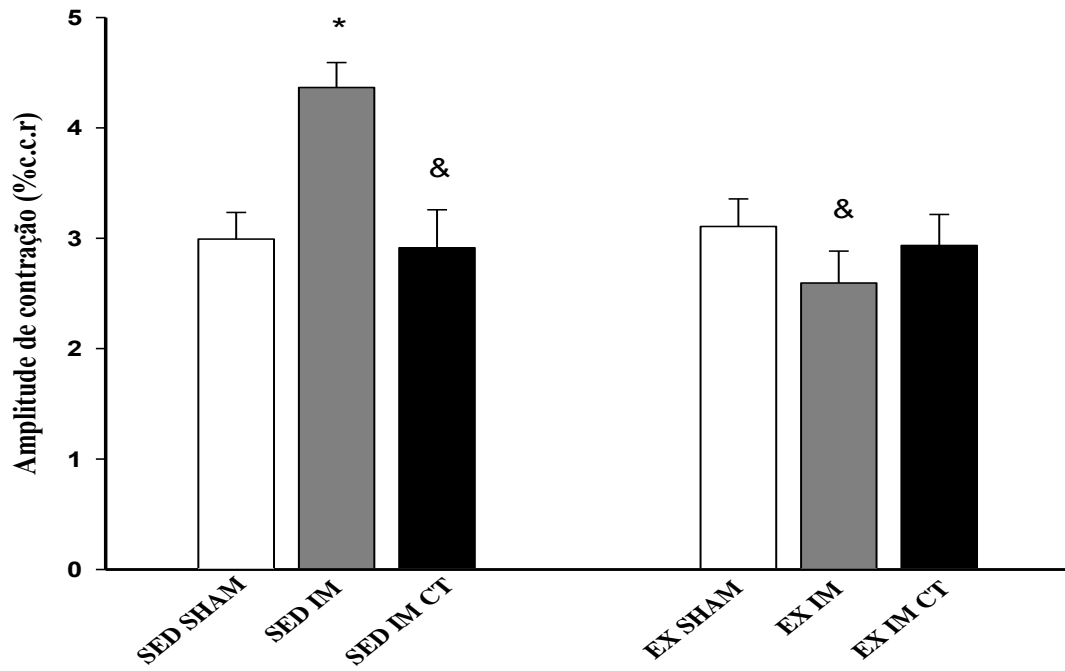
	SED SHAM	SED IM	SED IM CT	EX SHAM	EX IM	EX IM CT
	(n = 10 células por animal)	(n = 10 células por animal)	(n = 10 células por animal)	(n = 10 células por animal)	(n = 10 células por animal)	(n = 10 células por animal)
Comprimento (μm)	171,00 \pm 3,87	170,72 \pm 3,32	173,80 \pm 3,87	174,50 \pm 3,77	175,33 \pm 3,56	171,00 \pm 3,87
Largura (μm)	16,90 \pm 0,52	17,55 \pm 0,46	16,60 \pm 0,53	16,53 \pm 0,52	16,89 \pm 0,49	16,50 \pm 0,53
Razão C/L (μm)	10,58 \pm 0,40	10,27 \pm 0,36	10,97 \pm 0,42	11,22 \pm 0,41	10,96 \pm 0,39	10,97 \pm 0,42
Volume celular (mm^3)	21,85 \pm 0,79	22,66 \pm 0,70	21,85 \pm 0,81	21,69 \pm 0,79	22,26 \pm 0,75	21,50 \pm 0,81

Os dados são expressos como média \pm EPM de 10 células de cada animal por grupo experimental. Os grupos de tratamento são: SED SHAM: grupo de sedentários que foram submetidos à cirurgia simulada; SED IM: grupo de sedentários e infartados; SED IM CT: grupo de sedentários e infartados que foram submetidos à terapia com CTMs; EX SHAM: grupo de exercitados que foram submetidos a cirurgia simulada; EX IM: grupo de exercitados e infartados; EX IM CT: grupo de exercitados e infartados que foram submetidos à terapia com CTMs. Razão C/L: Razão do comprimento pela largura celular. Nível de significância: $p \leq 0,05$. Teste Estatístico: Análise fatorial 2 x 3 com *post hoc* de Holm Sidak.

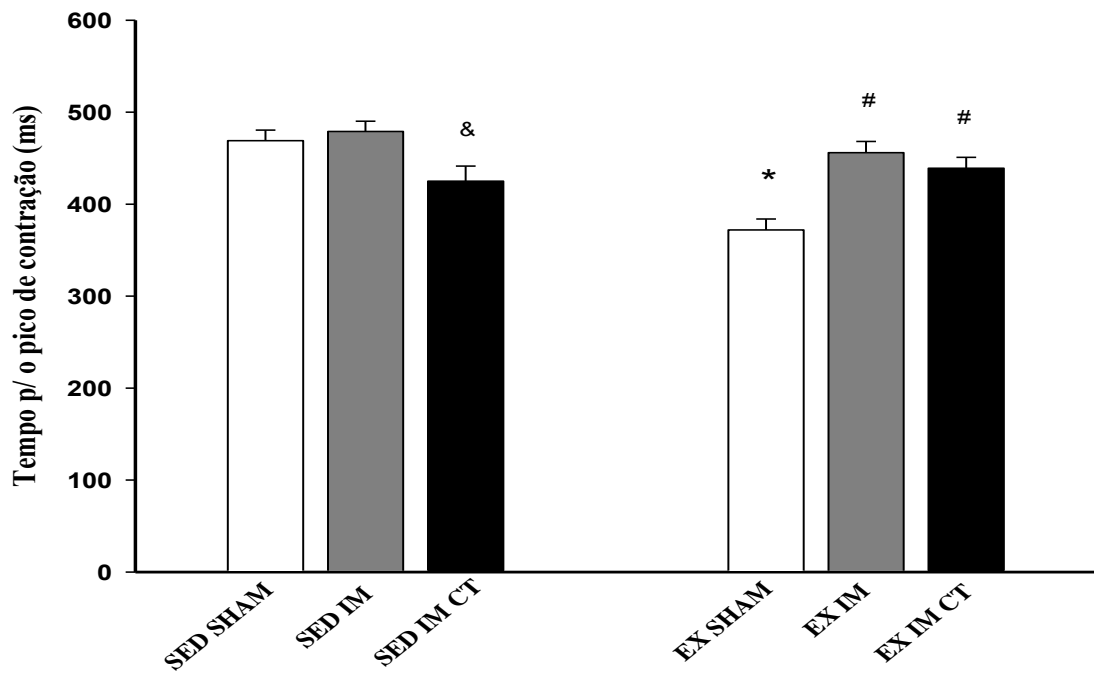
6.5 Contratilidade dos cardiomiócitos do VD

Os parâmetros relativos à amplitude de contração, tempo para o pico de contração e tempo para 50% do relaxamento celular são apresentados na figura 8.

A



B



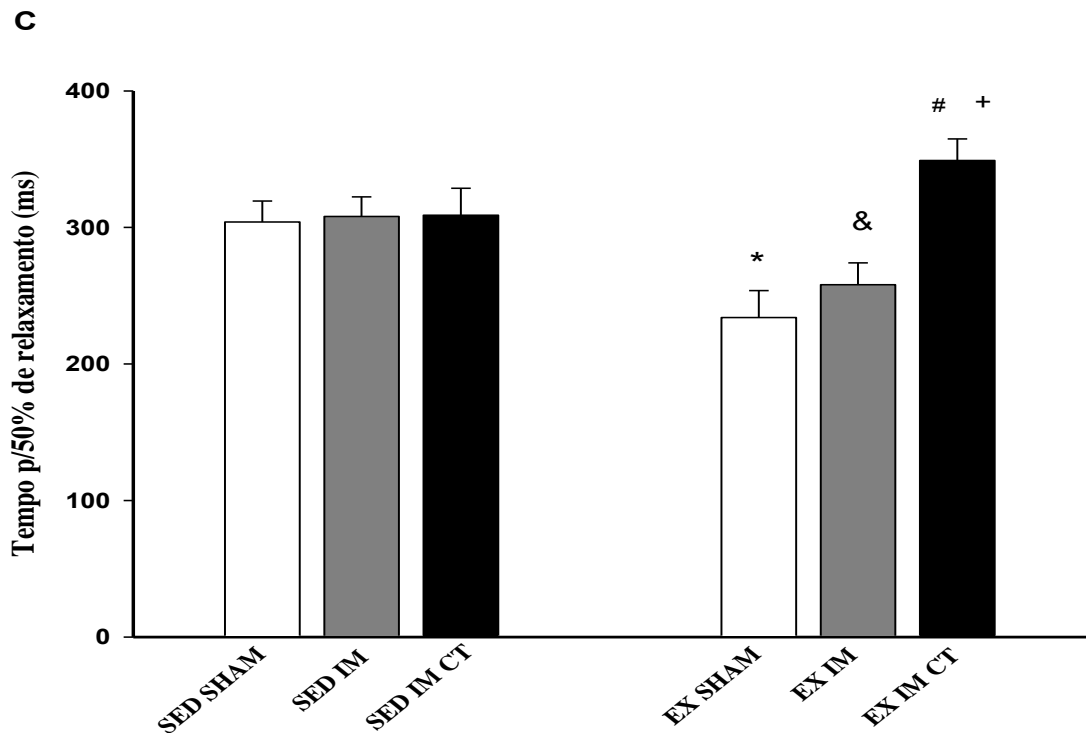


Figura 8: (A) Amplitude de contração dos cardiomiócitos (% do comprimento celular de repouso - % c.c.r); (B) Tempo para o pico de contração (milisegundos - ms); (C) Tempo para 50% do relaxamento (milisegundos - ms). Os grupos de tratamento são: SED SHAM: grupo de sedentários que foram submetidos à cirurgia simulada; SED IM: grupo de sedentários e infartados; SED IM CT: grupo de sedentários e infartados que foram submetidos à terapia com CTMs; EX SHAM: grupo de exercitados que foram submetidos a cirurgia simulada; EX IM: grupo de exercitados e infartados; EX IM CT: grupo de exercitados e infartados que foram submetidos à terapia com CTMs. Dados são expressos como média \pm EPM de 70 células por grupo. *, estatisticamente diferente do grupo SED SHAM; &, estatisticamente diferente do grupo SED IM; #, estatisticamente diferente do grupo EX SHAM; +, estatisticamente diferente do grupo EX IM; #, estatisticamente diferente do grupo EX SHAM. Teste estatístico: Análise fatorial 2 x 3 com *post hoc* de *Holm-Sidak*.

Em relação à amplitude de contração (Fig. 8 A), não foi observado nenhum efeito do fator IM, independentemente do fator exercício ou da terapia celular ($p > 0,05$). Já o fator treinamento promoveu uma redução ($p < 0,05$) da amplitude de contração celular (Sedentários = $3,42 \pm 0,16$ % c.c.r vs Treinados = $2,88 \pm 0,16$ % c.c.r), independentemente dos fatores IM e terapia celular. Não foram encontrados

efeitos do fator terapia celular, independentemente do fator exercício e IM ($p > 0,05$). Houve interação entre os fatores ($p < 0,05$) e não foram observados efeitos da associação dos tratamentos exercício e terapia celular ($p > 0,05$).

Assim, o grupo SED IM apresentou maior amplitude de contração ($p < 0,05$), em relação ao SED SHAM ($4,36 \pm 0,23\%$ c.c.r vs $2,99 \pm 0,24\%$ c.c.r, respectivamente). O grupo EX IM apresentou menor amplitude de contração, em relação ao SED IM ($2,59 \pm 0,29\%$ c.c.r vs $4,36 \pm 0,23\%$ c.c.r). A terapia com CTMs atenuou o aumento da amplitude nos animais SED IM CT ($p < 0,05$), em relação ao grupo SED IM ($2,91 \pm 0,34\%$ c.c.r vs $4,36 \pm 0,22\%$ c.c.r, respectivamente).

No tempo para o pico de contração celular (Fig. 8 B) não foi encontrado efeito do fator infarto ($p > 0,05$), independentemente dos fatores exercício e terapia celular. No entanto, o fator exercício promoveu uma redução ($p < 0,05$) nesse parâmetro, de maneira independente dos fatores IM e terapia celular (Sedentários = 460 ± 10 ms vs Treinados = 420 ± 10 ms). O fator terapia celular ($p < 0,05$) aumentou o tempo para o pico de contração, independentemente dos fatores infarto e exercício (Não Tratados = 420 ± 10 ms vs Tratados = 430 ± 10 ms). Houve interação entre os fatores ($p < 0,05$). Assim, o tempo para o pico de contração foi menor ($p < 0,05$) no EX SHAM que no SED SHAM. Todavia, esta diferença não foi encontrada entre os grupos EX IM e SED IM. Em contrapartida, a terapia com CTMs resultou em redução ($p < 0,05$) deste tempo quando se comparou o grupo SED IM CT com o SED IM (430 ± 20 ms vs 480 ± 10 ms, respectivamente).

Não foram encontrados efeitos da associação do treinamento com a terapia celular nesta variável (EX IM CT = SED IM CT = EX IM), para um nível de significância de $p > 0,05$.

Em relação ao tempo para 50% do relaxamento celular (Fig. 8 C) foi observado efeito do fator infarto, que aumentou os valores dessa variável ($p < 0,05$), independentemente dos fatores exercício e terapia celular (Não infartados = 270 ± 10 ms vs Infartados = 280 ± 10 ms). O fator exercício promoveu uma redução deste tempo ($p \leq 0,05$), independente do fator infarto ou ainda da terapia celular (Sedentários = 310 ± 10 ms vs Treinados = 280 ± 10 ms). O fator terapia celular aumentou o tempo para 50% de relaxamento ($p \leq 0,05$), independente dos fatores exercício e infarto (Não

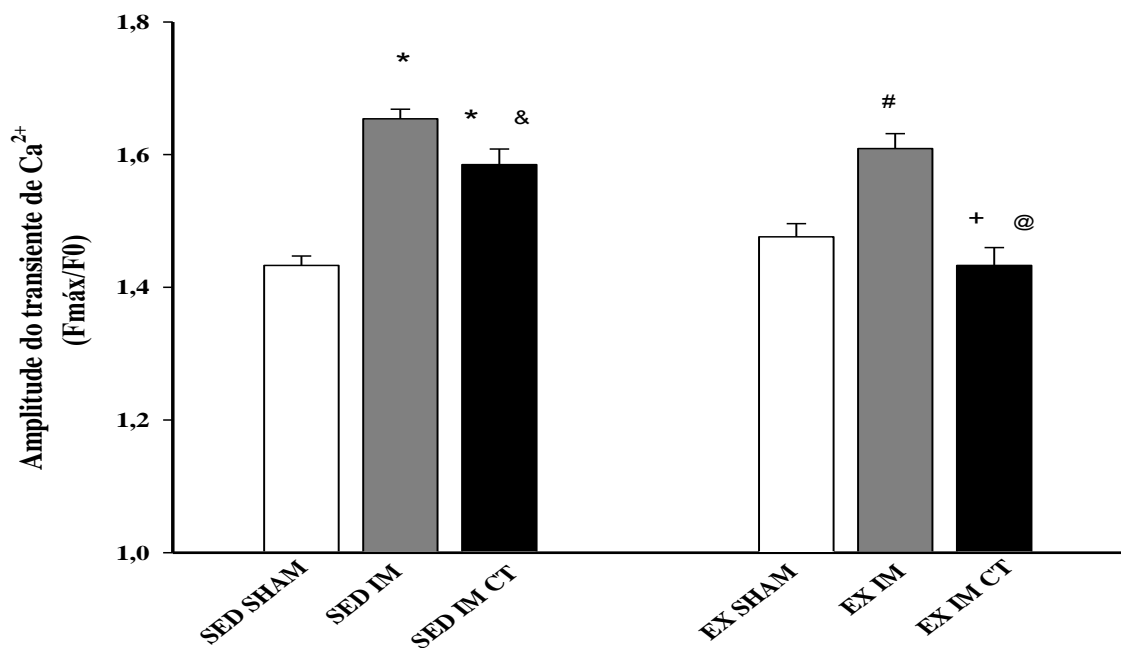
tratados = 270 ± 10 ms vs Tratados = 330 ± 10 ms). Houve interação entre os fatores ($p < 0,05$).

Assim, o treinamento teve um efeito benéfico reduzindo ($p < 0,05$) o tempo para 50% do relaxamento celular no grupo EX IM, em relação ao SED IM ($p < 0,05$). Nos animais treinados, a terapia celular aumentou o tempo de relaxamento celular (EX IM CT > EX IM). Todavia, isto não ocorreu nos animais sedentários (SED IM = SED IM CT) ($p > 0,05$). A associação dos tratamentos não afetou ($p > 0,05$) este parâmetro (EX IM CT = SED IM CT = EX IM).

6.6 Transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em cardiomiócitos do VD

Os parâmetros relativos à amplitude do transiente, tempo para o pico e para 50% do decaimento de $[Ca^{2+}]_i$ são apresentados na figura 9.

A



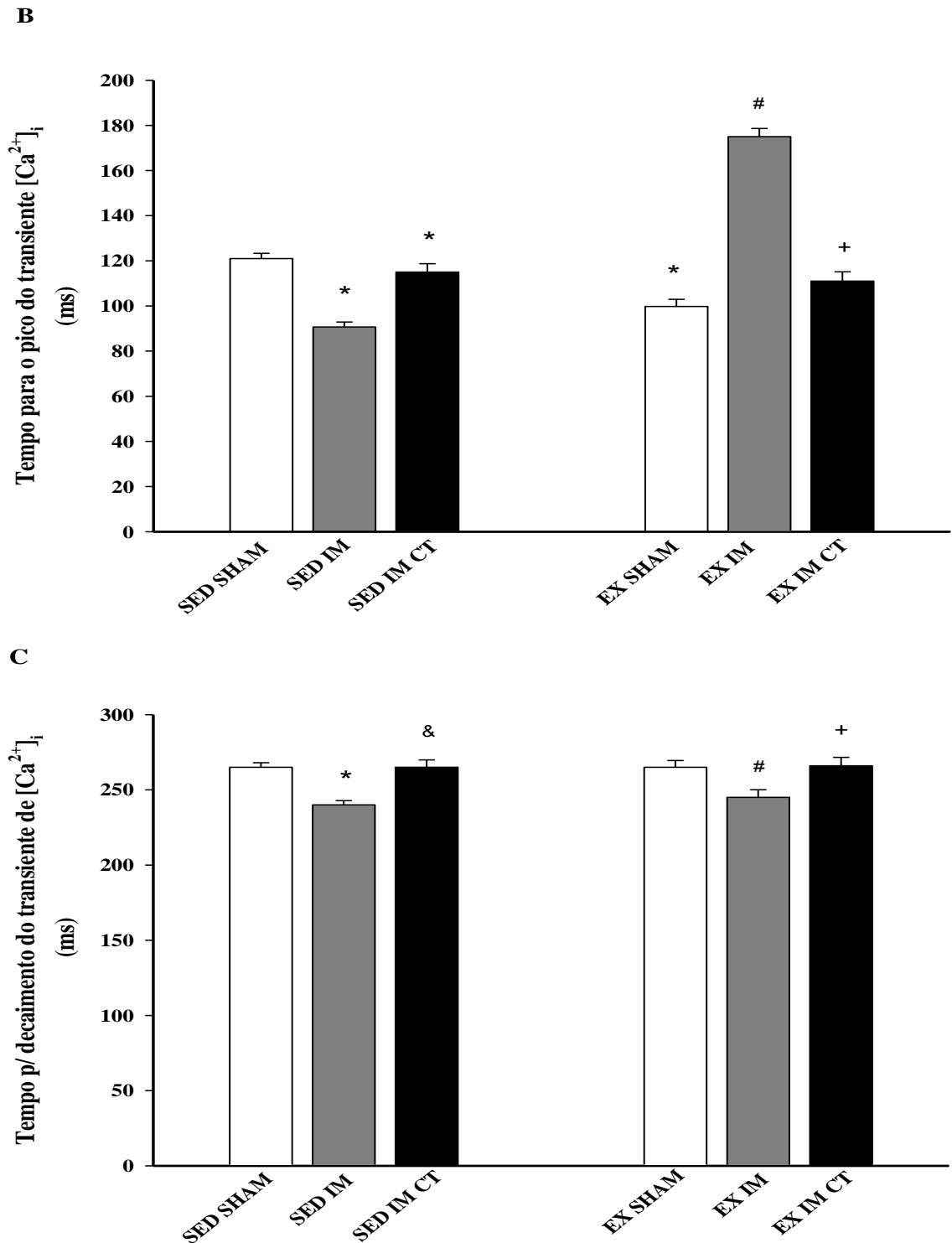


Figura 9: (A) Amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ ($F_{\text{máx}}/F_0$); (B) Tempo para o pico do transiente $[Ca^{2+}]_i$ (milissegundos - ms); (C) Tempo para decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (milissegundos - ms). Os grupos de tratamento são: SED SHAM: grupo de sedentários que foram submetidos à cirurgia simulada; SED IM: grupo de sedentários e infartados; SED IM CT: grupo de sedentários e infartados que foram submetidos à

terapia com CTMs; EX SHAM: grupo de exercitados que foram submetidos a cirurgia simulada; EX IM: grupo de exercitados e infartados; EX IM CT: grupo de exercitados e infartados que foram submetidos à terapia com CTMs. Dados são expressos como média \pm EPM de 70 células por grupo. *, estatisticamente diferente do grupo SED SHAM; &, estatisticamente diferente do grupo SED IM; #, estatisticamente diferente do grupo EX SHAM; #, estatisticamente diferente do grupo EX SHAM; +, estatisticamente diferente do grupo EX IM; @, estatisticamente diferente do grupo SED IM CT. Teste estatístico: Análise fatorial 2 x 3 com *post hoc* de *Holm-Sidak*.

O fator infarto promoveu aumento na amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ ($p < 0,05$), de forma independente dos fatores exercício ou terapia celular (Não infartados = $1,45 \pm 0,01$ Fmáx/F0 vs Infartados = $1,63 \pm 0,01$ Fmáx/F0). Foi observado ainda uma redução da amplitude ($p < 0,05$) promovida pelo fator exercício, independentemente dos fatores infarto ou da terapia celular (Sedentários = $1,56 \pm 0,01$ Fmáx/F0 vs Treinados = $1,51 \pm 0,01$ Fmáx/F0). Foi encontrado efeito do fator terapia celular, que aumentou a amplitude do transiente ($p < 0,05$), independentemente dos fatores exercício e infarto (Não tratados = $1,45 \pm 0,01$ Fmáx/F0 vs Tratados = $1,51 \pm 0,02$ Fmáx/F0). Houve interação entre os fatores ($p < 0,05$).

Pode-se perceber na figura 9A que a amplitude do transiente do $[Ca^{2+}]_i$ no grupo SED IM é maior em relação ao grupo SED SHAM ($p < 0,05$). Todavia, não houve diferença entre os grupos EX IM e SED IM ($p > 0,05$). A terapia celular, de maneira isolada, atenuou esse aumento ($p < 0,05$) nessa variável (SED IM CT < SED IM). No que tange aos tratamentos associados, observa-se que o grupo EX IM CT apresenta menor amplitude que as dos grupos SED IM CT e EX IM ($p < 0,05$).

No que diz respeito ao tempo para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, o fator infarto promoveu aumento ($p < 0,05$), independente dos fatores exercício e terapia celular (Não infartados = $111 \pm 1,95$ ms vs Infartados = $133 \pm 2,13$ ms). O fator exercício promoveu inesperado aumento no tempo para o pico do transiente ($p < 0,05$), independentemente dos fatores infarto e terapia celular (Sedentário = $109 \pm 1,63$ ms vs Treinados = $129 \pm 2,12$ ms). O fator terapia celular aumentou este tempo (Não tratados = $111 \pm 1,95$ ms vs Tratados = $113 \pm 0,02$ ms), independentemente dos fatores exercício e infarto ($p > 0,05$). Houve interação entre os fatores ($p < 0,01$).

Verificou-se redução ($p < 0,05$) oriunda do IM (SED IM) em relação ao grupo SED SHAM para o pico do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 9B). O treinamento aumentou ($p < 0,05$) o tempo para essa variável no grupo EX IM em relação ao SED IM. No que tange ao efeito isolado da terapia com células tronco (SED IM vs SED IM CT), foi encontrado aumento no tempo para o pico do transiente $[Ca^{2+}]_i$ ($p < 0,05$). Não foi observado efeito associado das terapias (EX IM CT = EX IM = SED IM CT) ($p > 0,05$).

Em relação ao tempo para 50% de decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ dos cardiomiócitos, o fator infarto promoveu uma redução ($p < 0,05$), independente dos fatores exercício e terapia celular (Não infartados = $270 \pm 10ms$ vs Infartados = $240 \pm 10ms$). Nenhuma alteração ($p > 0,05$) foi promovida pelo fator exercício ($p > 0,05$), independentemente dos fatores IM ou da terapia com CTMs, e nem pelo fator terapia celular, de maneira independente do exercício e infarto. Não houve interação entre os fatores ($p > 0,05$).

A figura 9C mostra que o IM reduziu ($p < 0,05$) o tempo para 50% do decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em relação ao seu sedentário SHAM ($240 \pm 10ms$ vs $270 \pm 10ms$, respectivamente). Não foi verificado efeitos do treinamento no grupo EX IM em relação ao ao seu sedentário controle (SED IM) para um nível de significância de $p > 0,05$. Contudo, pode-se observar um aumento ($p < 0,05$) deste parâmetro nos animais SED IM CT, em relação ao grupo SED IM ($270 \pm 10ms$ vs $240 \pm 10ms$, respectivamente). Não foram observados efeitos da associação das terapias (EX IM CT = EX IM = SED IM CT) ($p > 0,05$).

7 DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi verificar a influência do treinamento físico aeróbio associado à terapia com CTMs na morfologia e função do VD de ratos com infarto induzido no VE.

Os resultados do presente estudo mostraram que o IM promoveu adaptações deletérias ao miocárdio dos animais capazes de reduzir a função do VD (redução da TAPSE), assim como na contratilidade celular (aumento da amplitude de contração celular, sem afetar o tempo para o pico de contração e o tempo para 50% de relaxamento) e no transiente do $[Ca^{+2}]_i$ (aumento na amplitude do transiente e redução do tempo para o pico e para 50% de decaimento). O protocolo de treinamento adotado melhorou a capacidade funcional do VD pós IM (aumento da TAPSE), bem como promoveu alterações na contratilidade celular (redução da amplitude de contração e do tempo para 50% do relaxamento) e no transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (aumento do tempo para o pico do transiente). A terapia celular atenuou a redução da função do VD, reduziu a amplitude e o tempo para o pico de contração celular, bem como reduziu a amplitude e aumentou o tempo para o pico e o tempo para 50% de decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em cardiomiócitos isolados do VD. A associação da terapia celular com o treinamento físico resultou na redução da amplitude do transiente de $[Ca^{+2}]_i$ em cardiomiócitos isolados do VD. Não foram verificadas alterações promovidas nem pelo IM, EX, CTMs ou ainda pela associação do EX com a terapia com CTMs na morfologia do VD ou dos cardiomiócitos isolados do VD.

7.1 Protocolo de treinamento físico adotado

O protocolo de treinamento físico em esteira rolante utilizado foi eficaz em melhorar o desempenho dos animais no protocolo de corrida progressivo. Sabe-se que a capacidade de corrida e, por sua vez, o esforço físico possui uma correlação com o consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}), como descrito por Prímola-Gomes (2009) em animais com alto desempenho. Como adaptações ao treinamento físico incluem-se melhoras na resposta vasodilatadora do endotélio vascular, na resposta ventilatória, assim como modificações na musculatura esquelética (Pina et al., 2004, Jorge et al.,

2011). Os resultados do presente estudo estão de acordo com os encontrados em outros trabalhos evidenciando que um protocolo de treinamento aeróbio de baixa a moderada intensidade aumenta tanto a capacidade de exercício como a tolerância a esse, em humanos pós IM (Belardinelli et al., 1999; Silva et al., 2002) e em modelo experimental de infarto (Jorge et al., 2011).

Outro parâmetro utilizado para avaliar o efeito do treinamento foi à frequência cardíaca de repouso. Os resultados mostraram um efeito positivo do treinamento que resultou em redução da FC de repouso, o que pode ser atribuído a ajustes na modulação simpática e parassimpática promovidos pelo treinamento físico (Negrão et al., 1992; Pinto et al., 2006; Mostarda et al. 2009), assim como por alteração eletrofisiológica intrínseca no nodo sinoatrial (Ex. redução de canais iônicos – HCN4; e corrente iônica I_f) (D'Souza et al., 2014).

7.2 Peso corporal, pesos absoluto e relativo do coração e ventrículos, tamanho do infarto e conteúdo de água dos pulmões

Todos os animais ganharam peso corporal ao longo do estudo, quando comparados com o seu peso inicial. Entretanto, os tratamentos, isoladamente ou em associação, não afetaram esta variável. Isso está em concordância com estudos prévios em animais infartados sem (Brown et al., 2003; Bozi et al., 2013; Ramos et al., 2013) e com associação à terapia com CTMs (Lavorato, 2014).

Os dados do presente estudo mostram que a cirurgia de oclusão da ACADE ocasionou infarto com extensão de 15-30%, que pode ser caracterizado como pequeno a moderado. Este índice é suficiente para o estabelecimento da insuficiência cardíaca e consequentemente para ocorrência de remodelamento cardíaco, todavia, quanto maior o IM, maiores os prejuízos funcionais (Pfeffer et al., 1979, Pfeffer et al., 1991).

O IM aumentou o peso do coração, o peso ventricular (VE + VD + septo interventricular) e a razão peso ventricular pelo peso corporal. A hipertrofia ventricular reflete o remodelamento cardíaco adverso, principalmente do VE (Zornoff et al., 1997; Pfeffer et al., 1990; Cohn et al., 2000, Pfeffer et al., 1979, Pfeffer et al., 1991, Ramos 2013, Lavorato, 2014). A hipertrofia ocasionada após IM possui característica excêntrica, com aumento do estresse parietal na diástole, gerando, assim, uma

manutenção passageira da função cardíaca, que em pouco tempo evolui para uma dilatação ventricular crônica (Zornoff et al., 1997; Pfeffer et al., 1990; Cohn et al., 2000). Nessa perspectiva, o tamanho percentual do IM no grupo SED IM (30,40%) o classifica como moderado, de acordo com a literatura (Pfeffer et al., 1979, Pfeffer et al., 1991), o que é suficiente para gerar uma remodelação ventricular adversa.

No entanto, o IM não afetou o peso do VD ou a razão peso do VD pelo peso corporal. Isso indica que a cirurgia não promoveu alterações que pudessem causar sobrecarga no VD suficiente para hipertrofiar esta câmara ou ainda porque a falência do VE não tenha atingido o estágio em que acarrete alterações no VD, como devido a progressão para a insuficiência cardíaca congestiva, edema pulmonar e a redução funcional do VD. Por exemplo, nestes animais não houve diferença entre os animais SHAM e IM quando foram comparados os conteúdos de água dos pulmões.

O protocolo de treinamento aplicado no presente estudo foi capaz de reduzir o tamanho do infarto sugerindo, assim, um efeito benéfico ao remodelamento ventricular. Este resultado está de acordo com os de outro trabalho utilizando o VE (Wu et al., 2009) onde um treinamento físico de baixa intensidade (60 min, 50–70% VO₂max) iniciado 24 horas após o IM em camundongos (12 m/min, 10° inclinação, 60 min/dia) e realizado durante 3 dias foi suficiente para reduzir o tamanho do infarto (Treinados = 18 ± 3% vs Sedentários = 29 ± 7%). Segundo os autores, o melhor fluxo sanguíneo coronário bem como a elevação dos níveis proteicos do mRNA do fator de crescimento vascular endotelial promovidos pelo treinamento físico são os possíveis mecanismos responsáveis pela redução no tamanho do IM. No VD, o treinamento possivelmente compensou uma falha no VE aumentando a quantidade de sangue circulante no coração contribuindo para a redução na deposição de colágeno.

No presente estudo a terapia isolada com CTMs nos animais sedentários (SED IM CT) não foi capaz de reduzir os efeitos deletérios nos pesos do coração, ventrículos bem como nas relações analisadas no presente estudo. Contudo, o tamanho do IM foi reduzido nesse grupo de tratamento (15 %) em relação ao grupo SED IM (30,40%). Esse efeito pode ser em função do efeito cardioprotetor da terapia celular na prevenção do acometimento de uma maior área do miocárdio viável. A infusão intravenosa de CTMs após IM promove aumento da densidade capilar, preservação da função cardíaca, redução da taquicardia ventricular, atenuação do adelgaçamento 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 administração sistêmica de CTMs humanas em modelos experimentais de IM promoveu uma redução no número total de monócitos/macrófagos no tecido cardíaco (Saparov et al., 2013). Entretanto, o número de células CD206+ e F4/80+ aumentou no grupo de animais que receberam CTMs. O aumento no número alternativamente de macrófagos ativados/anti-inflamatórios pode ser mediado por um aumento da expressão de IL-10 e diminuição da expressão de IL-1 β e IL-6 no lugar da lesão isquêmica (Dayan et al., 2011). Em adição, as CTMs em camundongos aumentam a produção de IL-10 e IL12p40 enquanto a produção de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL12p70 pelos ativados macrófagos peritoneais diminui. O efeito modulatório das CTMs foi dependente de contato célula com célula e fatores solúveis, que foi parcialmente mediado pela prostaglandina E2 (Maggini et al., 2010). A redução do processo inflamatório das CTMs associado ao tempo de aplicação pós IM utilizado no presente estudo pode ter sido fundamental na atenuação do estresse ocasionado por esse evento isquêmico, visto que o miocárdio ainda se encontrava na fase de reparação inicial (Jugdutt et al., 2003) e o processo de formação de fibrose estava ainda se iniciando.

Conforme demonstrado pela detecção das CTMs somente no pulmão e não no coração dos animais, a via de administração intravenosa utilizada no presente estudo pode ocasionar a retenção das CTMs em órgãos que fazem a filtração sanguínea como o pulmão, fígado ou baço (Sackstein et al., 2008). Hipotetiza-se que essa retenção no pulmão possa ser devido ao tamanho celular e diâmetro dos capilares pulmonares. Comparações entre diferentes diâmetros celulares e uso de vasodilatadores evidenciaram a retenção ou liberação das células para a corrente arterial (Scherepfer et al., 2007). Todavia, a eficácia terapêutica das CTMs infundidas de forma intravenosa depende do extravasamento da circulação e da enxertia onde as CTMs podem apresentar atividades tróficas e parácrinas locais, ou ainda, habitar um tecido e liberar fatores imunomodulatórios na vasculatura que exercem efeitos sistêmicos.

Todavia, no presente estudo, quando a terapia celular foi conjugada com o treinamento físico não houve redução do percentual de área infartada. Em contraste, Cosmo e colaboradores (2012) encontraram uma redução da área infartada no VE no grupo tratado com células-tronco mononucleares (dose de 5×10^6 células) e exercitado

após o IM em ratos *Wistar*. É importante destacar que estes autores injetaram as células-tronco no miocárdio. Portanto, ainda permanecem inconclusivos os meios pelos quais a associação terapêutica do exercício físico com células-tronco não diminuiu a deposição de colágeno no miocárdio dos animais infartados.

A ausência de diferenças no peso do coração, dos ventrículos, do VD e nas razões analisadas (PV/PC e PVD/PC) entre os animais exercitados e sedentários demonstra que o treinamento de 12 semanas não foi suficiente para alterar estes parâmetros durante a remodelação do coração, principalmente no que concerne ao VD. No entanto, alguns trabalhos demonstram que protocolos de treinamento podem alterar a deposição de colágeno (De Waard et al., 2007), bem como a dilatação do VE (Orenstein, et al., 1995). Sabe-se que a deposição de colágeno na matriz extracelular, regulada pelas MMPs e TIMP (Holmes et al., 2005; Xu et al., 2008), e que a reabsorção de tecidos mortos podem interferir no peso final da câmara cardíaca, não refletindo, assim, o peso real do ventrículo (Zornoff et al., 2009). Acredita-se que a IC induzida pelo IM não foi suficiente para ocasionar alterações no peso do coração, principalmente no VD.

7.3 Morfologia do VD e dos cardiomiócitos isolados

No presente trabalho não foram detectadas alterações, seja de forma macroscópica (espessura das paredes do VD em diástole ou em sístole) ou celular (comprimento, largura, razão comprimento/largura ou volume dos cardiomiócitos) no VD promovidas pelo infarto, exercício, terapia celular ou pela associação do exercício com a terapia celular.

Estes dados indicam que o infarto ocorrido no VE não refletiu em um rearranjo morfológico no VD após as 12 semanas. O rearranjo celular ocorre para compensar as células mortas, o que pode acabar expandindo a cavidade cardíaca ocasionando a hipertrofia cardíaca patológica (Sutton & Sharpe, 2000). A interdependência dos ventrículos através do septo interventricular não foi suficiente para induzir alterações na geometria do VD, mantendo, assim, a sua conformação inicial.

Em relação ao exercício, alguns trabalhos demonstraram que, em humanos, o alargamento do VD esteve em paralelo com o do VE, o que dá suporte ao conceito de

que o treinamento aeróbico promove efeitos balanceados, ou seja, é um fenômeno biventricular (Scharf et al., 2010; D'Andrea et al., 2011; Kim et al., 2011). No entanto, a extrapolação, por completo, das alterações ocorridas no VE oriundas de um IM ou mesmo de um protocolo de treinamento ao VD é desaconselhável dada às peculiaridades dessa câmara cardíaca, visto que isso depende da extensão do IM e se o ramo da coronária direita também acabou sendo acometida de alguma forma.

Acredita-se em respostas diferenciadas (VE vs VD) ao estímulo para o crescimento celular, apesar da ligação através do septo interventricular. Essa diferenciação pode ser advinda das formações embrionárias diferenciadas destes tecidos, interferindo assim no remodelamento cardíaco: o ventrículo esquerdo é oriundo do campo cardíaco primário enquanto o ventrículo direito surgiu a partir de células do campo cardíaco anterior (Vitarelli et al., 2010). Essa origem embrionária diferenciada pode ser o fator responsável pelo exacerbado comportamento hipertrófico no VE e não no VD.

O espessamento da parede do VD na hipertensão arterial pulmonar possui um grau variável e existem evidências que alterações na expressão gênica (ex. diminuição na expressão da α -miosina de cadeia pesada bem como aumento na expressão da β -miosina de cadeia pesada) podem interferir na sobrecarga de pressão e no enchimento desse ventrículo (Vitarelli et al., 2010). No aspecto clínico, as alterações na expressão gênica dessas proteínas e uma cardiomiopatia ou hipertensão pulmonar, podem, dessa forma, controlar a hipertrofia no VD (Zeisberg et al., 2005).

A ausência de diferenças nos parâmetros morfológicos avaliados no VD pode ter ocorrido também em função da menor sobrecarga a que esta cavidade está submetida em comparação com o VE, com pequena influência na expressão de proteínas que controlam a hipertrofia nessa câmara cardíaca. O fato de não ter havido diferença entre o peso/conteúdo de líquido nos pulmões dos animais IM e SHAM indica que não houve congestão pulmonar suficiente para aumentar a pressão pulmonar e, conseqüentemente, a sobrecarga no VD. Outro aspecto a ser considerado é que o tamanho do IM e o protocolo de treinamento adotado no presente estudo não foram suficientes para induzir alterações morfológicas no VD.

7.4 Função do VD e de cardiomiócitos isolados

7.4.1 Função do VD

Sabe-se que a TAPSE reflete o componente longitudinal de contração do VD (Carlsson et al., 2007) e é amplamente utilizada como parâmetro de avaliação do funcionamento do VD, tanto em humanos (D'Andrea et al., 2010; Mercer-Rosa et al., 2013) como em animais (Andersen et al., 2008; van Dem Brom et al., 2010).

Os dados do presente estudo revelaram que o IM reduziu a TAPSE, em comparação aos animais do grupo SED SHAM. Estudos com hipertensão e doenças cardiovasculares têm demonstrado que quanto menor o valor para a TAPSE maior o risco de mortalidade (Ghio et al., 2000; Forfia et al., 2006). Por exemplo, em estudo realizado com ratos diabéticos, van Dem Brom et al. (2010) encontraram uma redução nos valores de TAPSE, associada à redução na função do VD. Esse estudo demonstrou também uma correlação positiva entre o percentual da fração de encurtamento e a TAPSE, ou seja, quanto maiores os valores para TAPSE, maiores os valores para a fração de encurtamento.

No presente estudo, o treinamento físico, isoladamente, melhorou a função do VD nos animais IM, demonstrando, assim, a eficácia do protocolo de treinamento adotado em melhorar a capacidade funcional do VD, na condição pós IM experimental. No estudo de Rimensberger e colaboradores (2013) foi analisado a TAPSE em corredores de maratona e ultra atletas de *endurance*. Os autores não encontraram diferenças entre os atletas e os controles. No presente estudo, porém, o IM promoveu efeitos deletérios na função do VD (redução da TAPSE), que foram revertidos pelo treinamento aplicado.

A terapia com células-tronco, de maneira isolada (SED IM CT), foi capaz atenuar a redução na TAPSE quando comparada ao grupo SED IM. Isto indica que houve melhora da função cardíaca do VD em resposta à terapia celular, mesmo que o IM tenha sido realizado no VE. Andersen e colaboradores (2008) reportaram aumento da função do VD, por meio da TAPSE, em camundongos com bandagem da artéria pulmonar tratados com sildenafil. O sildenafil é usado no tratamento de pacientes com hipertensão pulmonar, pois é um potente vasodilatador pulmonar que também inibe a proliferação celular nas artérias.

Os dados do presente estudo sugerem que, apesar da ausência de sobrecarga no VD, como constatado pelo conteúdo de água nos pulmões, houve efeito cardioprotetor das CTMs. Lee et al. (2009) demonstraram que a infusão intravenosa de CTMS humanas reduziu o tamanho do infarto e produziu melhora funcional no miocárdio de ratos. Isto ocorreu, em parte, porque as células retidas como um êmbolo no pulmão regularam a expressão de múltiplos genes, como grande aumento da proteína anti-inflamatória TSG-6. Essa proteína é de grande interesse devido ao seu conhecido efeito anti-inflamatório e porque a resposta inflamatória excessiva contribui para as alterações patológicas após IM (Moschal et al., 2008). A proteína TSG-6 suprime a excessiva resposta inflamatória, diminuindo o dano proteolítico ao coração e, conseqüentemente, tecido fibroso cicatricial e função cardíaca (Lee et al., 2009).

Em contrapartida, não foi observado efeito da associação da terapia celular com o treinamento físico em relação à função do VD (EX IM CT = EX IM = SED IM CT). Tal ausência de diferenças refuta a hipótese do presente estudo e ainda permanece por ser respondida em futuros estudos.

O aumento na TAPSE foi independente de alterações nas paredes do VD (sem alterações no diâmetro do VD em sístole e em diástole e a espessura da parede do VD também em sístole e em diástole). Sabe-se que uma maior força de contração está relacionada a uma maior musculatura cardíaca, contudo, essa ausência de alterações nas paredes e lúmen do ventrículo sugerem que ocorreram adaptações miofibrilares que melhoraram o aparato contrátil otimizando a função do VD.

7.5 Propriedades mecânicas dos cardiomiócitos isolados

7.5.1 Efeitos do infarto agudo do miocárdio

No presente estudo, o IM aumentou a amplitude de contração, sem afetar o tempo para o pico de contração e o tempo para 50% de relaxamento celular. Em concordância, o IM promoveu aumento na amplitude do transiente, mas com redução do tempo para o pico e para 50% de decaimento do transiente de $[Ca^{+2}]_i$. De modo geral, estas adaptações podem fazer parte de um mecanismo compensatório da bomba cardíaca na condição de IM.

O interesse na elucidação das alterações ocorridas no VD, em resposta ao IM no VE justifica-se pela marcada habilidade do VD em compensar o aumento na pós-carga ocasionado por um evento cardíaco dessa magnitude (Nahrendorf et al., 2003). Em células do VE, alterações clássicas provocadas pelo IM são: aumento na amplitude do transiente de $[Ca^{+2}]_i$ (Holt et al., 1998; Loennechen et al., 2002; Wisloff et al., 2002); redução na amplitude de contração (Holt et al., 1998; Loennechen et al., 2002; Wisloff et al., 2002; Bozi et al., 2013; Ramos et al., 2013); redução no tempo para o pico do transiente de $[Ca^{+2}]_i$ e no tempo para o pico de contração (Holt et al., 1998; Loennechen et al., 2002); e aumentos nos tempos de decaimento do transiente de $[Ca^{+2}]_i$, assim como do relaxamento celular (Holt et al., 1998; Wisloff et al., 2002; Bozi et al., 2013). Contudo, ainda são mais estudos necessários para uma melhor interpretação das alterações observadas no VD no presente estudo.

Em estudo recente neste modelo, Lavorato (2014) demonstrou que o IM promoveu aumento na amplitude de contração e do transiente de $[Ca^{+2}]_i$ no VE, assim como demonstrado no VD no presente estudo. O comprometimento cardíaco ocasionado pelo IM no VE provavelmente aumentou o trabalho do VD e fez com que as células dessa câmara fossem sobrecarregadas.

As alterações decorrentes do IM na contratilidade e no transiente de $[Ca^{+2}]_i$ são causadas por prejuízos na sinalização do Ca^{2+} (Su et al., 2001), sendo que ocorre alterações na expressão de proteínas responsáveis pela manutenção dos níveis citosólicos do Ca^{2+} , tais como redução na expressão da Ca^{+2} ATPase do RS (SERCA2) (Wisloff et al., 2002; Guo et al., 2003; Ahlers et al., 2005; Sallinen et al., 2007; Mackiewicz et al., 2008), do NCX (Gupta et al., 2000; Wisloff et al., 2002; Sallinen et al., 2007) entre outras. Esse mecanismo talvez tenha influenciando de alguma forma o AEC no VD, sendo que, possivelmente, alterações nas proteínas reguladoras do conteúdo de Ca^{2+} no citosol aumentaram a amplitude de contração e do transiente global de $[Ca^{+2}]_i$.

7.5.2 Efeitos do protocolo de exercício

O protocolo de treinamento físico adotado no presente estudo reduziu tanto a amplitude de contração quanto o tempo para 50% do relaxamento celular, sem afetar o

tempo para o pico de contração. Em relação ao transiente de $[Ca^{2+}]_i$, o treinamento aumentou o tempo para o pico do transiente, sem afetar a amplitude e nem o tempo para 50% de decaimento.

Sabe-se que o exercício físico regular promove importantes adaptações cardiovasculares em nível celular na condição de IM. Por exemplo, Bozi et al. (2012) encontrou aumento da amplitude de contração e velocidade máxima de contração e relaxamento em miócitos do VE em resposta ao exercício prévio ao IM. Em estudo similar, Lavorato (2014) encontrou aumento da amplitude do transiente de cálcio e redução do tempo de contração e relaxamento celular em miócitos do VE. Assim, os presentes dados sugerem que a redução da amplitude de contração nos miócitos do VD pode ter ocorrido em função de uma menor sobrecarga, oriunda de uma resposta positiva dos miócitos do VE ao treinamento aplicado. O aumento na eficiência na câmara esquerda com o treinamento após o IM exigiu menos do aparato contrátil do VD.

Da mesma forma, a resposta positiva do treinamento sobre o tempo de contração celular é explicada pelas alterações nas proteínas reguladoras do Ca^{2+} celular (Ex. aumento da expressão da SERCA2a) (Carneiro-Junior et al., 2013). Bitto et al. (2010) reportaram efeito positivo do exercício em roda de corrida voluntária, iniciado 24hs após IM, sobre a homeostasia do Ca^{2+} durante a diástole.

7.5.3 Efeitos da terapia com CTMs

A terapia com CTMs, isoladamente, reduziu a amplitude de contração e o tempo para o pico de contração, sem afetar o tempo para o relaxamento celular. No que tange ao transiente de $[Ca^{2+}]_i$, a terapia celular reduziu a amplitude, aumentou o tempo para o pico e o tempo para 50% de decaimento.

Acredita-se que a terapia celular com CTMs tenha melhorado a função contrátil do VE, conforme demonstrado por Lavorato (2014). Assim, é possível que a melhora do VE tenha sido suficiente para equilibrar a demanda do VD, em nível celular, o que fica evidenciado pela menor amplitude de contração celular e amplitude do transiente de $[Ca^{2+}]_i$, sem prejuízo da função ventricular.

A terapia celular parece ter tido importante papel nos resultados encontrados. Mesmo com a ausência de CTMs no coração, pois foram encontradas apenas nos pulmões, essas possuem a capacidade de atuar à distância pela secreção de fatores de crescimento e citocinas, sendo que os exossomos tem atraído muito a atenção dos pesquisadores. Exossomos são pequenas vesículas extracelulares que são secretadas por diferentes tipos celulares e contêm RNAs e proteínas que podem afetar várias funções biológicas. Tem sido demonstrado que os exossomos derivados das CTMs reduzem o tamanho do IM, diminuem o estresse oxidativo e morte celular em modelo experimental de IM ou mesmo em lesão por reperfusão cardíaca (Lai et al., 2010; Arslan et al., 2013). Assim, as CTMs, através de mecanismos como contato célula com célula ou mesmo através da produção de fatores solúveis, como os exossomos, cria um ambiente que suprime a produção de ROS (espécies reativas de O₂) por neutrófilos, polariza monócitos/macrófagos em direção a um fenótipo de ativação/anti-inflamatório, inibe a proliferação e geração de células T efetoras e contribui para o aumento no número de células T regulatórias. Como resultado, as CTMs previnem o remodelamento adverso no VE promovendo angiogênese e melhorando a função cardíaca (Saparov et al., 2013).

Tem sido postulado que no sistema nervoso as CTMs são capazes de fazer reparação não somente através de substituição celular como também providenciar suporte trófico e imunomodulatório para mecanismos de reparo endógeno (Martino et al., 2011). Esse tipo celular possui características únicas e que usam mecanismos distintos de interação com o ambiente e com os mecanismos regenerativos (Chicha et al., 2013).

No entanto, os resultados inesperados para o aumento no tempo para o pico e o tempo para 50% de decaimento do transiente de [Ca²⁺]_i ainda permanecem inconclusivos e, dessa forma, são necessários mais estudos.

7.5.4 Efeitos da associação exercício e terapia com CTMs

No presente estudo, a associação da terapia com CTMs com o treinamento aeróbio não afetou a amplitude de contração celular dos cardiomiócitos do VD. Todavia, esta associação reduziu a amplitude, sem afetar os tempos para o pico e o tempo para o decaimento do transiente global de [Ca²⁺]_i. Isto pode ter sido ocasionado

por uma melhora da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} , o que por sua vez, pode ocasionar melhoras no aparato contrátil muscular do coração. Porém, este parâmetro não foi avaliado no presente estudo.

Lavorato (2014) reportou que a associação do treinamento físico e a terapia com CTMs reduziu o tempo para o pico de contração e aumentou a amplitude do transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em miócitos do VE de ratos com IM. Isso pode auxiliar na explicação da adaptação encontrada no presente trabalho, visto que um melhor funcionamento do VE pode otimizar o trabalho do VD.

No entanto, é plausível considerar que outras estratégias de terapias celulares, tais como diferentes tempos de administração celular pós IM e diferentes concentrações celulares injetadas e formas de infusão podem surtir efeitos diferentes dos observados no presente estudo. Outro aspecto importante é o protocolo de treinamento adotado, talvez outras intensidades e outros tempos de início pós IM poderiam ter potencializar o efeito terapêutico das CTMs.

Diante dos resultados aqui apresentados, a associação dos tratamentos não afetou os parâmetros avaliados. Assim, a hipótese deste estudo de que a associação dos tratamentos poderia potencializar seus efeitos a morfologia e função do VD, assim como a morfologia e propriedades mecânicas de cardiomiócitos isolados do VD de ratos com IM experimental no VE foi negada.

8 CONCLUSÃO

Os dados do presente estudo permitem concluir que:

a) nenhum dos três fatores avaliados no presente estudo (infarto no VE, treinamento físico ou terapia com CTMs) causa efeitos sobre a morfologia estrutural ou dos miócitos isolados do VD;

b) o infarto experimental no VE promove comprometimento tecidual do VE (30%) e deteriora a função do VD (redução da TAPSE). O infarto experimental no VE aumenta a amplitude e reduz os tempos para o pico e para 50% de decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos isolados do VD;

c) o protocolo de treinamento físico usado, de maneira isolada, reduz a área infartada no VE (21%), melhora da função do VD (aumento da TAPSE), aumenta a amplitude de contração celular e reduz o tempo para 50% do relaxamento em miócitos isolados do VD. Em relação ao transiente de $[Ca^{2+}]_i$, o treinamento físico aumenta o tempo para o pico do transiente;

d) a terapia com CTMs usada, de maneira isolada, reduz o percentual de área infartada no VE (15%), melhora a função cardíaca do VD (SED IM CT vs SED IM), reduz a amplitude e o tempo para o pico de contração celular, bem como diminui a amplitude do transiente e aumenta os tempos para o pico e para 50% de decaimento do transiente de $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos isolados do VD; e

e) a associação das terapias (treinamento físico e CTMs) exerce efeitos sobre os parâmetros avaliados (tamanho do infarto no VE, a função do VD, a contratilidade e o transiente de $[Ca^{2+}]_i$ miócitos isolados do VD).

9 REFERÊNCIAS

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 15;105(4):1815-22, 2005,

Ait Mou Y, Reboul C, Andre L, Lacampagne A, Cazorla O. Late exercise training improves non-uniformity of transmural myocardial function in rats with ischemic heart failure. *Cardiovasc Res*, v.81(3), p.555-64, 2009.

Andersen A, Nielsen JM, Peters CD, Schou, Sloth E, Nielsen-Kudsk JE. Effects of phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil in the pressure overloaded right heart. *European Journal of Heart Failure*, v.10, p.1158-1165, 2008.

Anversa P, Ricci R, Olivetti G. Effects of exercise on the capillary vasculature of the rat heart. *Circulation*, v.75, p.12-18. 1987.

Arslan F, Lai RC, Smeets MB, Akeroyd L, Choo A, Aguor EN, Timmers L, van Rijen, HV, Doevendans PA, Pasterkamp G. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res*, v.10, p.301–312, 2013

Balakumar P, Singh M. The possible role of caspase-3 in pathological and physiological cardiac hypertrophy in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 99, p. 418–424, 2006.

Bartelds B, Borgdorff MA, van Oosten, Takens J, Boersma B, Nederhoff MG, Elzenga NJ, van Gilst NH, De Windt LJ, Berger RMF. Differential responses of the right ventricle to abnormal loading conditions in mice: pressure vs. volume load. *European Journal of Heart Failure*, v.13, p.1275–1282, 2011.

Belardinelli R, Georgiou D, Cianci G, Purcaro A. 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(9), p.1173-82, 1999.

Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, v.415, n.6868, Jan 10, p.198-205, 2002a.

Bers DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. AH Dordrecht: Kluwer Academic, 2002b.

Bito V, De Waard MC, Biesmans L, Lenaerts I, Ozdemir S, van Deel E, Abdel-Mottaleb Y, Driesen R, Holemans P, Duncker DJ, Sipido KR. Early exercise training after myocardial infarction prevents contractile but not electrical remodelling or hypertrophy. *Cardiovasc Res*, v.86, n.1, Apr 1, p.72-81, 2010.

Bito V, Biesmans L, Gellen B, Antoons G, Macquaide N, Rouet-Benzineb P, Pezet M, Mercadier JJ, Karin R Sipido. FKBP12.6 overexpression does not protect against remodelling after myocardial infarction. *Exp Physiol*, v.98, p.134–148, 2013.

Bollini S, Smart N, Riley PR. Resident cardiac progenitor cells: At the heart of regeneration. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2010.

Bozi LH, Maldonado IR, Baldo MP, Silva MF, Moreira JB, Novaes RD, et al. Exercise training prior to myocardial infarction attenuates cardiac deterioration and cardiomyocyte dysfunction in rats. *Clinics*, v.68(4), p.549-556, 2013.

Brandes R, Bers DM. Intracellular Ca^{2+} increases the mitochondrial NADH concentration during elevated work in intact cardiac muscle. *Circ. Res*, v.80, p.82–87, 1997.

Brown DA, Jew KN, Sparagna GC, Musch TI, Moore RL. Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rat heart. *J Appl Physiol*, v.95, p.2510–2518, 2003.

Busatto VC, Cicilini MA, Mill JG. Increased angiotensin converting enzyme activity in the left ventricle after infarction. *Braz J Med Biol Res*, v.30, p.679- 687, 1997.

Carlsson M, Ugander M, Heiberg E, Arheden H. The quantitative relationship between longitudinal and radial function in left, right, and total heart pumping in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v.293, p.636-44, 2007.

Carneiro-Júnior M A, Prímola-Gomes TN, Quintão-Júnior JF, Drummond LR, Lavorato VN, Drummond FR, Felix LB, Oliveira EM, Cruz JS, Natali AJ, Mill JG. Regional effects of low-intensity endurance training on structural and mechanical properties of rat ventricular myocytes. *J Appl Physiol*, v.115, p.107-115, 2013.

Cerbai E, Barbieri M, Li Q, Mugelli A. Ionic basis of action potential prolongation of hypertrophied cardiac myocytes isolated from hypertensive rats of different ages. *Cardiovasc. Res*, v.28, p.1180–7, 1994.

Cheng H, Lederer WJ. Calcium Sparks. *Physiol Ver*, 88, p.1491–1545, 2008.

Chicha L, Smith T, Guzman R. Stem cells for brain repair in neonatal hypoxia-ischemia. *Childs Nerv Syst*, 30(1):37-46, 2014.

Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, Daemen MJ. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *American Journal of Pathology*, v147(2), p.325-38, 1995.

Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling: concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling: behalf of an

International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*, v.35(3), p.569-82, 2000.

Cosmo S, Francisco JC, Cunha RC, Macedo RM, Faria-Neto, Simeoni R, Carvalho KAT, Olandosk M, Miyague MI, Amaral VF, Guarita-Souza LC. 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(4), p.542-51, 2012.

Crisostomo PR, Meldrum DR. Stem cell delivery to the heart: clarifying methodology and mechanism. *Crit Care Med.*, 35(11):2654-6, 2007.

Dayan VG, Yannarelli F, Billia, P, Filomeno X, Wang JE, Davies AK. Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol*, v.106, p.1299–1310, 2011.

Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart*, v.83, p. 361–6, 2000.

Davies B, Elwood NJ, Li S, Cullinane F, Franzcog GA, Edwards GA, Newgreen DF, Brizard CP. Human Cord Blood Stem Cells Enhance neonatal Right Ventricular Function in an Ovine Model of Right Ventricular Training. *Ann Thorac Surg*, v.89, p.585-93, 2010.

D'Andrea A, Riegler L, Di Salvo G, Gravino R, Cocchia R, Castaldo F, Salerno G, Golia E, Limongelli G, De Corato G, Cuomo S, Pacileo G, Russo MG, Calabro R. Right ventricular myocardial involvement in either physiological or pathological left ventricular hypertrophy: an ultrasound speckle tracking two-dimensional strain analysis. *European Journal of Echocardiography*, v.11, p.492-500, 2010.

D'Andrea AL, Riegler E, Golia, et al. Range of right heart measurements in top-level athletes: the training impact. *Int J Cardiol*, 2011.

Dell'Italia LJ, Lembo NJ, Starling MR, Crawford MH, Simmons RS, Lasher JC, Blumhardt R, Lancaster R, O'Rourke RA. Hemodynamically important right ventricular infarction: follow-up evaluation of right ventricular systolic function at rest and during exercise with radionuclide ventriculography and respiratory gas exchange. *Circulation*, v.75, p.996-1003, 1987.

D'Souza AA, Bucchi AB, Johnsen SJRJ, Logantha O, Monfredi J, Yanni S, Prehar G, Hart, Cartwright E, Wisloff U, Dobryznski H, DiFrancesco D, Morris GM, Boyett MR. Exercise training reduces resting heart rate via downregulation of the funny channel HCN4. *Nature communications*, 2014.

de Resende MM, Kauser K, Mill JG. Regulation of cardiac and renal mineralocorticoid receptor expression by captopril following myocardial infarction in rats. *Life Sci*, v.78, p.3066-3073, 2006.

de Waard MC, van der Velden J, Bito V, Ozdemir S, Biesmans L, Boontje NM, Dekkers DH, Schoonderwoerd K, Schuurbiens HC, De Crom R, Stienen GJ, Sipido KR, Lamers LM, Duncker DJ. Early exercise training normalizes myofilament function and attenuates left ventricular pump dysfunction in mice with a large myocardial infarction. *Circ Res*, Apr 13;100(7), p.1079-88, 2007.

Diffie GM. Adaptation of cardiac myocyte contractile properties to exercise training. *Exerc Sport Sci Rev*, v.32(3), p.112-9, 2004.

Erlebacher JA., Weiss JL, Weisfeldt ML, Bulkley BH. 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(2), p.201-8, 1984.

Fabiato A, Fabiato F. Dependence of the contractile activation of skinned cardiac cells on the sarcomere length. *Nature*, v.256, n.5512, Jul 3, p.54-6, 1975.

Fabiato A, Fabiato F. Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles. *Ann N Y Acad Sci*, v.307, Apr 28, p.491-522, 1978.

Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, Laine GA, Cox Jr. Pulmonary Passage is a Major Obstacle for Intravenous Stem Cell Delivery: The Pulmonary First-Pass Effect. *Stem Cells And Development*. v.18(5), 2009.

Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in therat. *Am J Pathol*, v.90, p.57-70, 1978.

Fletcher PJ, Pfeffer JA, Pfeffer MA, Braunwald E. Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction: effects on systolic function. *Circ Res*, v.49, p.618-26, 1981.

Forfia, PR, Fisher MR, Mathai SC, Houston-Harris T, Hemnes AR, Borlaug BA, et al. Tricuspid annular displacement predicts survival in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, v.174, p.1034-41, 2006.

Frangogiannis N. The immune system and cardiac repair. *Pharmacological Research*. v.58(2), p.88-111, 2008.

Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: The good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol*, v.65, p.45-79, 2003.

Gaudron P, Hu K, Schamberger R, Budin M, Walter B, Ertl G. Effect of endurance training early or late after coronary artery occlusion on left ventricular remodeling, hemodynamics, and survival in rats with chronic transmural myocardial infarction. *Circulation*, v.89, p.402-412, 1994.

Ghio S, Recusani F, Klersy C, Sebastiani R, Laudisa, Campana C, et al. Prognostic usefulness of the tricuspid annular plane systolic excursion in patients with congestive heart failure secondary to idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, v.85, p.837-42, 2000.

Gnecchi M, Danieli P, Cervio E. Mesenchymal stem cell therapy for heart disease. *Vascul Pharmacol*.19;57(1):48-55, 2012.

Guo X, Chapman D, Dhalla NS. 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(1-2), p.163-72, 2003.

Gupta S, Prahash AJ, Anand IS. Myocyte contractile function is intact in the postinfarct remodeled rat heart despite molecular alterations. *Cardiovasc Res*, v.48(1), p.77-88, 2000.

Hammerman H, Schoen FJ, Kloner RA. Short-term exercise has a prolonged effect on scar formation after experimental acute infarction. *J Am Coll Cardiol*, v.2(5), p.979-82, 1983.

Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, Gerstenblith G, DeMaria AN, Denktas AE, Gammon RS, Hermiller JB Jr, Reisman MA, Schaer GL, Sherman W. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymalstem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.*, 8;54(24):2277-86, 2009.

Hochman JS, Healy B. Effect of exercise on acute myocardial infarction in rats. *J Am Coll Cardiol*, v.7, p.126 –132, 1986.

Holt E, Tønnessen T, Lunde PK, Semb SO, Wasserstrom JA, Sejersted OM, Christensen G. Mechanisms of cardiomyocyte dysfunction in heart failure following myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol*, v.30(8), p.1581–93, 1998.

Holmes JW, Borg TK, Cowel JW. Structure and mechanics of healing myocardial infarction. *Ann Rev Biomed Eng*, v.7, p.223-53, 2005.

Houser SR, Piacentino V, Weisser J. Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. *J Mol Cell Cardiol*, v.32, n.9, Sep, p.1595-607, 2000.

Jorge L, Rodrigues B, Rosa KT, Malfitano C, Loureiro TC, Medeiros A, Curi R, Brum PC, Lacchini S, Montano N, De Angelis K, Irigoyen MC. Cardiac and peripheral adjustments induced by early exercise training intervention were associated with autonomic improvement in infarcted rats: role in functional capacity and mortality. *Eur Heart J*, v32(7), p.904-12, 2011.

Jugdutt BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation*, v.108, p.1395-403, 2003.

Kemi OJ, Macquaide N, Hoydal MA, Ellingsen O, Smith GL, Wisloff U. Exercise Training Corrects Control of Spontaneous Calcium Waves in Hearts From Myocardial Infarction Heart Failure Rats. *J. Cell. Physiol*, 227: 20–26, 2012.

Kim JH, Noseworthy PA, McCarty D, et al. Significance of electrocardiographic right bundle branch block in trained athletes. *Am J Cardiol*, v.107, p.1083-1089, 2011.

Kirchberger MA, Tada M, Katz AM. Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, v.249, n.19, Oct 10, p.6166-73, 1974.

Klima UP, Guerrero JL, Vlahakes GJ. Myocardial perfusion and right ventricular function. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.*, 5:74-80, 1999.

Kloner, RA, Kloner JA. The effect of early exercise on myocardial infarct scar formation. *Am Heart J*, v.106, p.1009 –1013, 1983.

Lacerda AC, Marubayashi U, Balthazar CH, Leite LH, Coimbra CC. Central nitric oxide inhibition modifies metabolic adjustments induced by exercise in rats. *Neurosci Lett*, p.152-6, 2006.

Lai RC, Arslan, Lee MM, Sze NSK, Choo A, Chen TS, Salto-Tellez M, Timmers L, Lee CN, el Oakley RM. Exosome secreted by msc reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res*, v.4, p.214–222, 2010.

LAVORATO, Victor, N. *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 de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

Lehnart SE, Terrenoire C, Reiken S, Wehrens XH, Song S, Tillman EJ, Mancarella S, Coromilas J, Lederer WJ, Kass RS, Marks AR. Stabilization of cardiac ryanodine receptor prevents intracellular calcium leak and arrhythmias. *PNAS*, v.103(20), p7906-7910, 2006.

Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop DJ. 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.*, 2;5(1):54-63, 2009.

Li YX, Lincoln T, Mendelowitz D, Grossman W, Wei JY. Age-related differences in effects of exercise training on cardiac function in rats. *Am J Physiol*, v.251, p.12-18. 1986

Litwin, S. E. The rat model of postinfarction heart failure. *Heart Failure*, v.11, p.182-95. 1995.

Loennechen JP, Wisløff U, Falck G, Ellingsen O. Cardiomyocyte contractility and calcium handling partially recover after early deterioration during postinfarction failure in rat. *Acta Physiol Scand*, v.176(1), p.17-26, 2002.

Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: Pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*, v.102(4), p.470-9, 2000.

Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Moum T, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Forfang K. 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. *American Heart Journal*, v.154(4), 2007.

Mackiewicz U, Maczewski M, Konior A, Tellez, Nowis D, Dobrzynski H, Boyett HR, Lewartowski B. Sarcolemal Ca²⁺-ATPase ability to transport Ca²⁺ gradually diminishes after myocardial infarction in the rat. *Cardiovasc Res*, v.81(3), p.546-54, 2009.

Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, Holmberg J, Piazzón IM, Nepomnaschy I, Costa H, Cañones C, Raiden S, Vermeulen M. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *Plos One*, 2010.

Maheshwari M, Mittal RS. Right ventricle myocardial performance index versus Simpson's right ventricle ejection fraction in patients with isolated left ventricle anterior myocardial infarction. *Heart Views*, v.14, p.68-71, 2013.

Marks AR. Ryanodine receptors/calcium release channels in heart failure and sudden cardiac death. *J Mol Cell Cardiol*, v.33, n.4, Apr, p.615-24, 2001.

Martino G, Pluchino S, Bonfanti L, Schwartz M. Brain regeneration in physiology and pathology: the immune signature driving therapeutic plasticity of neuralstem cells. *Physiol Rev.*, 91(4):1281-304, 2011.

Marmor A, Geltman EM, Biello DR, Sobel BE, Siegel BA, Roberts R. Functional response of the right ventricle to myocardial infarction: dependence on the site of left ventricular infarction. *Circulation*, v.64, p.1005-11, 1981.

McIntyre KM, Sasahara A. The hemodynamic response to pulmonary embolism in patients without prior cardiopulmonary disease. *Am .J Cardiol*, 28-288, 1971.

Mercer-Rosa L, Parnell A, Forfia PR, Yang W, Goldmuntz E, Kawut EM. Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion in the Assessment of Right Ventricular Function in Children and Adolescents after Repair of Tetralogy of Fallot. *Journal of the American Society of Echocardiography*, v.26, p.1322-1329, 2013.

Middlekauff HR, Mark AL, The treatment of heart failure: the role of neurohumoral activation. *Intern Med*, 37(2):112-22, 1998.

Mirotsov M, Jayawardena TM, Schmeckpeper J, Gnechi M, Dzau VJ. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2011.

Mill JG, Gomes AP, Carrara AB, Gomes MG, Vassallo DV. Influence of chronic captopril therapy on the mechanical performance of the infarcted rat heart. *Pharmacol Res*, v.29, p.77-88, 1994.

Monteiro BS, Argolo NM, Del Carlo TJ. Células-tronco mesenquimais. *Ciência Rural*, v.40, p.238-245, 2010.

Mostarda C, Rogow A, Silva IC, De La Fuente RN, Jorge L, Rodrigues B, Heeren MV, Caldini EG, De Angelis K, Irigoyen MC. Benefits of exercise training in diabetic rats persist after three weeks of detraining. *Auton Neurosci*, v.145, n.1-2, p.11-16, 2009.

Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 88:471-488, 1997.

Nahrendorf M, Hu K, Fraccarollo D, Hiller KH, Haase A, Bauer WR, Ertl G. Time course of right ventricular remodeling in rats With experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* , v.284, p.241-248, 2003

Nardi NB, Meirelles LS. Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. *Handbook of Exp. Pharmacology*, 174:249-282, 2006.

Natali AJ, Turner DL, Harrison SM, White E. Regional effects of voluntary exercise on cell size and contraction-frequency responses in rat cardiac myocytes. *J Exp Biol*, v.204, n.6, p.1191-9, 2001.

Negrão CE, Moreira ED, Santos MC, Farah VM, Krieger EM. Vagal function impairment after exercise training. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, v.72, n.5, p.1749-53, 1992.

Orenstein TL, Parker TG, Butany JW, Goodman JM, Dawood F, Wen WH, 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, p.858-66, 1995.

Pescatello LS, Franklin BA, Fagard R, Farguhar WB, Kelley GA, C. A. Ray. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. *Med Sci Sports Exerc*, v.36, n.3, Mar, p.533-53, 2004.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner PA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res*, v.44, p.503-12, 1979.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steimberg BS, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation*, v.72, p.406-12, 1985.

Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodelling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*, v.81(4), p.1161-72, 1990.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol*, v.260, p.1406-14, 1991.

Pfisterer M, Emmenegger H, Soler M, Burkart F. Prognostic significance of right ventricular ejection fraction for persistent complex ventricular arrhythmias and/or sudden death after first myocardial infarction: relation to infarct location, size and left ventricular function. *Eur Heart J*, v.7, p.289-98, 1986.

Piacentino V, Weber CR, Chen X, Weisser-Thomas J, Margulies KB, Bers DM, Houser SM. Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res*, v.92, n.6, Apr 4, p.651-8, 2003.

Piao L, Fang Y, Cadete VJJ, Wietholt C, Urboniene D, Toth PT, Marsboom G, Zhang HJ, Haber I, Rehman J, Lopaschuk GD, Archer SL. The inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase improves impaired cardiac function and electrical remodeling in two models of right ventricular hypertrophy: resuscitating the hibernating right ventricle. *J Mol Med*, v.88, p.47-60, 2010.

Pina IL, Daoud S. Exercise and heart failure. *Minerva Cardioangiol*, v.52(6), p.537-46, 2004.

Pinamonti B, Dragos AM, Pyxaras SA, Merlo M, Pivetta A, Barbati G, Di Lenarda A, Morgera T, Mestroni L, Sinagra G. Prognostic predictors in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: results from a 10-year registry. *European Heart Journal*, v.32, p.1105–1113, 2011.

Pinto A, Di Raimondo D, Tuttolomondo A, Fernandez P, Arnao A, Licata G. Twenty-four hour ambulatory blood pressure monitoring to evaluate effects on blood pressure of physical activity in hypertensive patients. *Clin J Sport Med*, v.16, n.3, p.238-43, 2006.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v.284(5411), p.143-7, 1999.

Portes LA, Saraiva RM, dos Santos AA, Tucci PJF. Swimming training attenuates remodeling, contractile dysfunction and congestive heart failure in rats with moderate and large myocardial infarctions. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v.36, p.394–399, 2009.

Primola-Gomes TN, Campos LA, Lauton-Santos S, Balthazar CH, Guatimosim S, Capettini LS, Lemos VS, Coimbra CC, Soares DD, Carneiro-Junior MA, Quintão-Junior JF, Souza MO, Cruz JS, Natali AJ. Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes. *J Appl Physiol*, v.107, p.593-8, 2009.

Qin J, Valle G, Nani A, Nori A, Rizzi N, Priori SG, Volpe P, Fill M. Luminal Ca²⁺ regulation of single cardiac ryanodine receptors: insights provided by calsequestrin and its mutants. *J Gen Physiol*, v.131, n.4, p.325-34, 2008.

RAMOS, Regiane Maria Soares. *Efeitos do treinamento aeróbico de baixa intensidade iniciado 24 horas após infarto do miocárdio sobre a estrutura e função cardíaca de ratos*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

Rimensberger C, Carlen F, Brugger N, Seiler C, Wilhelm M. Right ventricular adaptations and arrhythmias in amateur ultra-endurance athletes. *Br J Sports Med.*, 48(15):1179-84, 2014.

Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond).*, 26;2:8, 2005.

Sackstein R, Merzaban JS, Cain DW, Dagia NM, Spencer JA, Lin CP, Wohlgemuth R. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nat. Med*, v.14, p.181–187, 2008.

Sallinen P, Manttari S, 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(1-2), p.97-103, 2007.

Saparov A, Chen C-W, Beckman SA, Wang Y, Huard J. The Role of Antioxidation and Immunomodulation in Postnatal Multipotent Stem Cell-Mediated Cardiac Repair. *Int. J. Mol. Sci.*, v.14, p.16258-16279, 2013.

Satoh H, Delbridge LM, Blatter LA, Bers DM. Surface:volume relationship in cardiac myocytes studied with confocal microscopy and membrane capacitance measurements: species-dependence and developmental effects. *Biophys J*, 70: 1494-1504, 1996.

Scharf M, Brem MH., Wilhelm M., et al. Cardiac magnetic resonance assessment of left and right ventricular morphologic and functional adaptations in professional soccer players. *Am Heart J*, v.159, p. 911-918, 2010.

Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fischbein MP, Robbins RC, Pelletier MP. Stem Cell Transplantation: The Lung Barrier. *Transplantation Proceedings*, v.39, p.573–576, 2007.

Seo JH, Cho SR. Neurorestoration induced by mesenchymal stem cells: potential therapeutic mechanisms for clinical trials. *Yonsei Med. J.*, v.53(6), p.1059-67. 2012.

Shah, V. K., K. Shalia. Stem Cell Therapy in Acute Myocardial Infarction: A Pot of Gold or Pandora's Box. *Stem Cells International*, 2011.

Setaro JF, Cleman MW, Remetz MS. The right ventricle in disorders causing pulmonary venous hypertension. *Cardiol Clin*, 10:165-183, 1992.

Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg.*, 73(6):1919-25, 2002.

Silva MSV, Bocchi EA, Guimarães GV, Padovani CR, Silva MHGG, Pereira SF, et al. Benefits of exercise training in the treatment of heart failure: Study with a control group. *Arq Bras Cardiol*, v.79, p.357-62, 2002.

Smarz K, Zaborska B, Chamiec TJ, Maciejewski P, Budaj A. Right Ventricular Dysfunction and Exercise Capacity After Inferior (Posterior) Wall Acute Myocardial Infarction. *Am J Cardiol*, v.110, p.784-789, 2012.

Stevens SCW, Terentyev D, Kalyanasundaram A, Periasamy M, Gyorke S. Intra-sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ oscillations are driven by dynamic regulation of ryanodine receptor function by luminal Ca²⁺ in cardiomyocytes. *J Physiol*, v.20, pp 4863-487, 2009.

Straburzyńska-Migaj E, Popiel M, Grajek S, Katarzyńska-Szymańska A, Lesiak M, Bręborowicz P, Sawiński K, Czyż A, Gil L, Kozłowska-Skrzypczak M, Komarnicki M. 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. *International Journal of Cardiology*, v.159, p. 134–138, 2012.

Su Z, Sugishita K, Ritter M, Li F, Spitzer KW, Barry WH. The sodium pump modulates the influence of I(Na) on [Ca²⁺]_i transients in mouse ventricular myocytes. *Biophys J*, v.80, p.1230-1237, 2012.

Sutton MGS, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction - Pathophysiology and therapy. *Circulation*, v.101, p.2981-8, 2000.

Takasago T, Imagawa T, Furukawa K, Ogurusu T, Shigekawa M. Regulation of the cardiac ryanodine receptor by protein kinase-dependent phosphorylation. *J Biochem*, v.109, n.1, Jan, p.163-70, 1991.

Timmers L, Lim SK, Hoefler IE, Arslan F, Lai RC, van Oorschot AA, Goumans MJ, Strijder C, Sze SK, Choo A, Piek JJ, Doevendans PA, Pasterkamp G, de Kleijn DP. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res.*, 6(3):206-14, 2011.

Trueblood NA, Inscore PR, Brenner D, Lugassy D, Apstein CS, Sawyer DB, et al. Biphasic temporal pattern in exercise capacity after myocardial infarction in the rat: relationship to left ventricular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v.288(1), p.244-9, 2005.

Van den Brom CE, WAM Bosmans J, Vlasblom R, Handoko LM, Huisman MC, Lubberink M, Molthoff CFM, Lammertsma AA, Ouwens MD, Diamant M, Boer C. Diabetic cardiomyopathy in Zucker diabetic fatty rats: the forgotten right ventricle. *Cardiovascular Diabetology*, p.9:25, 2010.

Vitarelli A, Terzano C. Do we have two hearts? New insights in right ventricular function supported by myocardial imaging echocardiography. *Heart Fail Rev*, v.15,p.39-61, 2010.

van Nierop BJ, van Assen HC, van Deel ED, Niesen LBP, Duncker DJ, Strijkers GJ, Nicolay K. Phenotyping of Left and Right Ventricular Function in Mouse Models of Compensated Hypertrophy and Heart Failure with Cardiac MRI. *Plos One*, v.8, 2013.

Voelkel NF, Quaife RA, Leinwand LA, Barst RJ, McGoon MD, Meldrum DR, Dupuis J, Long CS, Rubin LJ, Smart FW, Suzuki YJ, Gladwin M, Denholm EM, Gail DB. Right ventricular function and failure: report of a national heart, lung, and blood institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. *Circulation*, 114:1883-1891, 2006.

Völkers M, Rohde D, Zelniker T, Weiss CS, Giannitsis E, Katus HA, Meyer FJ. High-sensitive Troponin T increase after exercise in patients with pulmonary arterial hypertension. *BMC Pulmonary Medicine*, p.13-28, 2013.

Waring CD, Vicinanza C, Papalamprou A, Smith AJ, Purushothaman S, Goldspink DF, Nadal-Ginard B, Torella D, Ellison GM. The adult heart responds to increased workload with physiologic hypertrophy, cardiac stem cell activation, and new myocyte formation. *European Heart Journal*, 2012.

Wasserstrom JA, Sharma R, Kapur S, Kelly JE, Kadish AH, Balke CW. Multiple defects in intracellular calcium cycling in whole failing rat heart. *Circ Heart Fail*, v.2, n.3, May, p.223-32, 2009.

Weber KT, Sun Y, Guntaka RV. Rebuilding and remodeling following myocardial infarction: the good, the bad, and the ugly of tissue repair. *Dialogues in Cardiovascular Medicine*. V.4, p. 3-19, 1999.

Weir RAP, McMurray JJV, Velazquez EJ. Epidemiology of heart failure and left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction: Prevalence, clinical characteristics, and prognostic importance. *Am J Cardiol*, p.13-25, 2006.

Weiner BH, Alpert JS, Dalen JE, Ockene IS. Response of the right ventricle to exercise in patients with chronic heart disease. *Am Heart J*, v.105, p.386, 1983.

Westhoff-Bleck M, Schieffer B, Tegtbur U, Meyer GP, Hoy L, Schaefer A, EM Tallone, Tutarel O, Mertins R, Wilmlink LM. Aerobic training in adults after atrial switch procedure for transposition of the great arteries improves exercise capacity without impairing systemic right ventricular function. *International Journal of Cardiology*, v.170, p.24-29, 2013.

Williams JF, Potter RD. Effects of exercise conditioning on intrinsic contractile state of cat myocardium. *Circ. Res*, v.39, p.425:428, 1976.

Wisloff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Essingsen O. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, v.54,162-74, 2002.

Whittaker P, Boughner DR, Kloner RA. Role of collagen in acute myocardial infarct expansion. *Circulation*, v.84, p. 2123-2134, 1991.

Wolf D, Reinhard A, Seckinger A, Gross L, Katus HA, Hansen A. Regenerative capacity of intravenous autologous, allogeneic and human mesenchymal stem cells in the infarcted pig myocardium-complicated by myocardial tumor formation. *Scand Cardiovasc J*, 43(1):39-45, 2009.

Wu G, Rana JS, Wykrzykowska J, Du Z, Ke Q, Kang P, Li J, Laham RJ. Exercise-induced expression of VEGF and salvation of myocardium in the early stage of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v.296, p.389–395, 2009.

Xu X, Wan W, et al. Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade limits post-infarct ventricular remodelling in rats. *Cardiovasc Res*, v.78(3), p.523-32, 2008.

Zhang XQ, Musch TI, Zelis R, Cheung JY. Effects of impaired Ca²⁺ homeostasis on contraction in postinfarction myocytes. *J Appl Physiol.*, v.86(3), p.943-50, 1999.

Zeisberg EM, Ma Q, Juraszek AL, Moses K, Schwartz RJ, Izumo S, Pu WT. Morphogenesis of the right ventricle requires myocardial expression of Gata4. *J Clin Invest*, v.115, p.1522–1531, 2005.

Zornoff LAM, Spadaro J. Remodelação ventricular após infarto agudo do miocárdio: conceitos, fisiopatologia e abordagem terapêutica. *Arq Bras Cardiol*, v.68, p.453-60, 1997.

Zornoff LAM, Paiva SAR, Minicucci MF, Spadaro J. Experimental Myocardium Infarction in Rats: Analysis of the Model. *Arq Bras Cardiol*, v.93(3), p.403- 408, 2009.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick HM. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell*. 13:4279–4295, 2002.