

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
Centro de Ciências Biológicas e da saúde
Pós-graduação em Ciências da saúde

**O transplante autólogo de células tronco
mononucleares de medula óssea e atividade física de
alta intensidade pós infarto do miocárdio com
disfunção ventricular em ratos wistar**

Simone de Almeida Cosmo De Santis

CURITIBA

2012

SIMONE DE ALMEIDA COSMO DE SANTIS

**O transplante autólogo de células tronco
mononucleares de medula óssea e atividade física de
alta intensidade pós infarto do miocárdio com
disfunção ventricular em ratos wistar**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para ao título de Mestre.

Orientador: Dr. Luiz Cesar Guarita Souza

Curitiba

2012

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus e a Nossa Senhora, por minha vida, pela minha saúde, a família maravilhosa que me deu, por me guiar pelos caminhos certos e sempre estar ao meu lado nas horas difíceis e nunca me deixar desistir.

Agradeço aos meus pais, Enivaldo Cosmo e Neuza Aparecida de Almeida Cosmo; por todas as lições ensinadas, pela compreensão, amor e dedicação em toda a minha vida. Sinto sua falta pai!!! Amo demais vocês!!!

Ao meu amor, meu marido Luis Fernando De Santis por ser meu maior fã, e por me incentivar a ir sempre mais longe, me fazendo acreditar que eu posso muito mais!!! Te amo.

Meu agradecimento à baixinha mais doce desse mundo, minha filha Maria Fernanda que estava na minha barriga e já defendia seminários como ninguém, você é o maior milagre do amor de Deus por nossa família, te amo muito filha!!!

Aos meus irmãos Olga, Cláudia e João Carlos, por estarem sempre me apoiando, me incentivando e acreditando em mim. Amo vocês!

Em especial ao meu orientador Dr. Luiz Cesar Guarita Souza, pela orientação, por toda paciência e atenção, confiança, seriedade, críticas, profissionalismo, muito obrigada de coração!!!

Agradeço imensamente ao grande profissional Julio Francisco, do Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental- PUCPR, por aceitar me ajudar em todo este trabalho, pelo empenho e disposição, materiais, revisões e críticas. Sua ajuda fez este trabalho realmente acontecer!!!!

Gostaria de agradecer também ao amigo Ricardo Cunha que ajudou e muito nos trabalhos práticos, muito obrigada!!!

Ao professor Nelson Itiro Miyague, por ter feito as análises ecocardiográficas, muito obrigada!

A professora Vivian do Amaral, por ser a pessoa mais querida e profissional que já conheci, por suas aulas, por suas palavras de apoio e por seus "milagres", meus agradecimentos!!!

Aos técnicos do Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental- PUCPR, Misael Gomes Barbosa e Devanir Lino, por me ajudarem e muito durante os procedimentos dos exercícios dos ratos, quantos baldes de água carregamos hein!!! Muito obrigada de coração!!!

Agradeço a minha grande amiga Kyrana da Costa, por todos os artigos que me enviou e que me ajudaram tanto na tese quanto nas disciplinas do mestrado, você faz parte desta conquista.

A minha amiga Paula Carleton, por traduzir esse resumo, muito obrigada, Paulinha!!!

A coordenação do curso e todos os professores que no decorrer de todo o curso se empenharam compartilhando o conhecimento e contribuindo imensamente para meu crescimento intelectual, pelas sugestões, críticas e dedicação.

A todos os meus amigos pelos momentos de conversa, convivência, compreensão, ajuda, companheirismo e pela troca de experiências.

A todos que de alguma forma participaram desta minha conquista.

Muito obrigada!

Sumário

	Pag
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
SUMMARY	
1 INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA.....	5
3 OBJETIVOS.....	7
3.1 Objetivo geral.....	8
3.2 Objetivos específicos.....	8
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
4.1. Anatomia das artérias coronárias em ratos.....	10
4.2 Modelos experimentais de Infarto agudo do miocárdio (IAM) através da ligadura da artéria coronária.....	11
4.3 Fisiopatologia.....	13
4.4 Métodos de quantificação do IAM em modelos experimentais.....	18
4.5 Célula mononucleares.....	20
4.5.1 Origem.....	20
4.5.2 Classificação.....	21
4.5.3 Células-tronco da Medula Óssea.....	22
4.5.4 Uso Terapêutico: Reparo do Miocárdio.....	24
4.6 Exercício físico na Insuficiência Cardíaca.....	26
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
5.1 Fluxograma do protocolo de pesquisa.....	35

5.2	Anestesia.....	36
5.3.	Obtenção de via aérea e ventilação.....	36
5.4	Posição do animal durante o experimento.....	37
5.5	Descrição do procedimento.....	38
5.6	Ecocardiografia.....	40
5.7	Exercício.....	42
5.7.1	Protocolo de adaptação.....	42
5.7.2	Protocolo de treinamento.....	42
5.7.3	Análise sanguínea do lactato.....	43
5.8	Obtenção do sangue da medula óssea.....	44
5.8.1	Isolamento das células da medula óssea, fração mononuclear...	44
5.8.2	Transplante das células.....	46
5.9	Eutanásia.....	47
5.10	Estudo anatomo-patológico.....	47
5.10.1	Análise Morfométrica.....	48
5.11	Análise Estatística.....	49
6.	RESULTADOS.....	50
6.1	Análise ecocardiográfica intra grupo.....	51
6.2	Análise ecocardiográfica inter grupos.....	54
6.3	Análise do Lactato.....	57
6.4	Anatomia patológica.....	60
6.4.1	Análise do colágeno.....	60
7	DISCUSSÃO.....	62
8	CONCLUSÕES.....	72
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

Abreviaturas e Símbolos

ATC	angioplastia intracoronária
CFU-F	unidade formadora de colônia-fibroblasto
FE	fração de ejeção-
G-CSF	fator de estimulação de colônia de granulócitos
GM-CSF	fator de estimulação macrófago-granulócito
IAM	infarto agudo do miocárdio
IC	insuficiência cardíaca
PC	pesos corporais
RS	retículo sarcoplasmático
SCF	fator de célula tronco
SD com	sedentário com células
SD sem	sedentário sem células
SD	sedentário
SDc	sedentário com células
TR com	treinado com células
TR sem	treinado sem células
TRI	treinado
TRlc	treinado com células
VD	ventrículo direito
VDF	volume diastólico final
VDF	volume diastólico final
VDFVE	volume diastólico final do ventrículo esquerdo
VE	ventrículo esquerdo
VSF	volume sistólico final
VSF	volume sistólico final
VSFVE	volume sistólico final do ventrículo esquerdo

Lista de Figuras

	Pag.
Figura 1 A e B	A - Animal intubado conectado ao sistema de ventilação mecânica. B – Respirador a volume..... 35
Figura 2 A e B	Posição do animal (A) e início da toracotomia lateral esquerda com 1,5 cm de extensão (B)..... 36
Figura 3 A e B	Exposição do coração para o procedimento (A) e aspecto do mesmo após a ligadura da coronária esquerda (B)..... 37
Figura 4	Aparelho de ecocardiografia bidimensional para animais de pequeno porte..... 38
Figura 5 -	Imagem ecocardiográfica mostrando a área do ventrículo esquerdo..... 39
Figura 6	Piscina usada na atividade física dos animais..... 41
Figura 7	Anel formado de células-tronco mononucleares..... 43
Figura 8	Gráfico da Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo..... 49
Figura 9	Gráfico do Volume Sistólico Final do Ventrículo Direito..... 50
Figura 10	Gráfico do Volume Diastólico Final do Ventrículo Esquerdo..... 51
Figura 11	Variação dos valores de lactato entre o período entre o período basal e 30 dias após a atividade física..... 55
Figura 12	Valores do colágeno na área do infarto..... 57

Lista de Tabelas

	Pag.
Tabela 1 Comparação dos resultados intra-grupo.....	52
Tabela 2 Valores ecocardiográficos trinta dias após o infarto do miocárdio nos parâmetros de fração de ejeção e volume diastólico final do ventrículo esquerdo.....	53
Tabela 3 Relação ao parâmetro do VDP logo após o infarto.....	53
Tabela 4 Relação ao parâmetro do VSF após sessenta dias do infarto.....	54
Tabela 5 Comparação dos resultados intra-grupos. Valores do lactato basal e 30 dias após a atividade física de alta intensidade.....	54
Tabela 6 Valores de lactato em comparação dois a dois nos períodos basal e após trinta dias de atividade física de alta intensidade.....	55
Tabela 7 Valores de colágeno, na área no infarto.....	56
Tabela 8 Valores de colágeno, na área no infarto, comparação dois a dois.....	56

RESUMO

Introdução: As células-tronco tem apresentado resultados importantes pós infarto do miocárdio. O treinamento físico tem sido amplamente utilizado como importante tratamento não farmacológico no manejo de doenças cardiovasculares. No entanto, resultados referentes à utilização de tratamentos associados ainda são controversos e poucos explorados.

Objetivo: Analisar o efeito funcional e anátomo-patológico do transplante de células mononucleares da medula óssea associada à atividade física aquática pós infarto do miocárdio em ratos. **Método:** Foram induzidos ao infarto do miocárdio, por meio de ligadura da coronária esquerda 21 ratos Wistar. Após uma semana, os animais foram submetidos à ecocardiografia para avaliação da fração de ejeção (FE,%) e dos volumes diastólico e sistólico finais do ventrículo esquerdo (VDF, VSF, ml), randomizados e o transplante das células tronco mononucleares. Os animais foram divididos em quatro grupos: grupo sedentário sem células (n 5), sedentário com células (n 5), treinado sem células (n 5) e treinado com células (n 6). O treinamento físico foi iniciado 30 dias após o infarto e realizado em piscina adaptada durante 30 dias. No início e no final do protocolo de treinamento físico foram realizadas dosagens de lactato. Os animais foram submetidos à nova ecocardiografia após sessenta dias do infarto do miocárdio.

Resultados: Dois meses após o transplante, foram observados diminuição da FE no grupo controle ($35,20 \pm 7,64\%$ para $23,54 \pm 4,56\%$ $p=0,022$) e acréscimo da FE e estabilização do remodelamento ventricular no grupo treinado com células ($29,85 \pm 6,68\%$ para $33,43 \pm 7,56\%$, $p=0,062$ e $0,71 \pm 0,13\text{ml}$ para $0,73 \pm 0,06\text{ml}$, $p=0,776$, respectivamente). Identificou-se a diminuição de fibras colágenas, nas regiões de fibrose miocárdica no grupo treinado com e sem células. **Conclusão:** O grupo treinado com células apresentou uma tendência de melhora da função ventricular em relação ao grupo controle, sugerindo o benefício da terapia celular associado à atividade física.

Descritores: infarto do miocárdio, transplante, células tronco, atividade física.

ABSTRACT

Introduction: The stem-cells have presented important results post myocardial infarction. Physical training has been used as a better treatment for cardiovascular disease than pharmacological means. Therefore, results referent to the use of both treatments are still controversial and little explored.

Goal: Analyze the functional effect and pathological anatomy of the transplant of cell mononuclear of bone marrow associated to the physical aquatic activity post myocardial infarction in mice.

Method: They were induced to myocardial infarction, via ligation of the left coronary in 21 Wistar rats. After one week, the animals were submitted to the echocardiography to evaluate the ejection fraction (EF, %) and the diastolic and systolic volumes finals of the left ventricle (DVF, SVF, ml), randomized and the transplant of stem cell mononuclears. The animals were divided in four groups: the sedentary group without cells (n5), the sedentary with cells (n5), the trained without cells (n5) and trained with cells (n6). The physical training started thirty days after the myocardial infarction and continued in an adapted swimming pool for thirty additional days. At the beginning and at the end of the physical training protocol were performed dosages of lactate. The animals were submitted to the new echocardiography after sixty days of the myocardial infarction. **Results:** Two months after the transplant, it was observed decrease of EF (ejection fraction) in the group control ($35,20 \pm 7,64\%$ for $23,54 \pm 4,56\%$ $p=0,022$) and increase of EF and stabilization of ventricular remodeling in the group trained with cells ($29,85 \pm 6,68\%$ to $33,43 \pm 7,56\%$, $p=0,062$ and $0,71 \pm 0,13\text{ml}$ to $0,73 \pm 0,06\text{ml}$, $p=0,776$, respectively). It identified the decrease of collagen fibers, in the regions of myocardial fibrosis in the group trained with and without cells. **Conclusion:** The group trained with cells showed a trend to improvement of the ventricular function relative to the control group, suggesting the benefit of cell therapy associated to the physical activity.

Descriptors: myocardial infarction, transplant, stem cells, physical activity.

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares, principal causa de morte no mundo, representaram 27,3% dos 946.392 óbitos registrados no Brasil em 2000 e constituem-se nas principais causas de morbi-mortalidade, sendo o infarto agudo do miocárdio a mais freqüente dentre as doenças isquêmicas do coração. O infarto do miocárdio caracteriza - se pela diminuição do aporte sangüíneo que leva a perda de tecido e prejuízo da função cardíaca, sendo um processo de irreversibilidade da vitalidade tecidual ^(1, 2).

Os avanços tecnológicos na terapêutica e no diagnóstico têm aumentado muito a sobrevivência dos pacientes, contudo as terapêuticas disponíveis para o tratamento do infarto do agudo miocárdio (IAM) ainda são paliativas e limitadas, evidenciando a necessidade de desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas. Apesar de alguns autores sugerirem que haja divisão mitótica do coração a grande maioria dos cardiomiócitos não tem a capacidade de regeneração após o infarto do miocárdio e quando isto ocorre existe uma deterioração da atividade contrátil, e sendo a área do infarto extensa pode ocorrer o remodelamento ventricular e a insuficiência cardíaca ⁽³⁾.

Estudos experimentais recentes indicam a possibilidade de regeneração miocárdica por meio de transplante de células tronco, como alternativa para o tratamento desta enfermidade. Várias linhagens celulares têm sido investigadas em modelos experimentais ⁽⁴⁻⁸⁾.

Em modelos experimentais de isquemia miocárdica aguda e crônica, o implante de células mononucleares de medula óssea foi capaz de

melhorar a contração e a perfusão miocárdica. Tais resultados foram reproduzidos em estudos clínicos recentes em humanos ⁽⁹⁻¹⁰⁾.

Exercícios físicos sistematicamente realizados resultam em grande parte mudanças no organismo. As mudanças têm o seu lugar ao nível das estruturas celulares, dos tecidos, dos órgãos e do corpo como um todo. As mudanças estendem-se desde os processos metabólicos celulares com seus mecanismos moleculares até a capacidade funcional das estruturas celulares dos órgãos e de seus sistemas. Alterações pronunciadas têm sido encontradas em relação aos mecanismos de controle das funções corporais e dos processos metabólicos, incluindo os níveis de auto-regulação celular, hormonal e neural ⁽¹¹⁾.

A atividade física pode produzir alterações na perfusão miocárdica. O fluxo coronariano é inversamente proporcional a resistência vascular exercida em grande parte pelos vasos situados na microcirculação. O aumento do metabolismo cardíaco produzido pelo exercício promove a diminuição do tônus vascular (microcirculação) melhorando por consequência a perfusão miocárdica. Esta melhora pode ser considerada expressiva, quando considerados ainda outros componentes envolvidos no processo como: a função endotelial, a microcirculação, a regressão das lesões arteroscleróticas coronarianas, o aumento da circulação colateral, redução da viscosidade do sangue e aumento do tempo de perfusão diastólica ⁽¹²⁻¹³⁾.

Xu *et al* demonstraram que em ratos com infarto do miocárdio, submetidos ao exercício físico em esteira apresenta melhores resultados em

relação à restauração de zonas musculares, analisando a quantidade de colágeno na área de cicatriz⁽¹⁴⁾.

2 JUSTIFICATIVA

O transplante de células tronco da medula óssea no infarto do miocárdio com disfunção ventricular e a atividade física em esteira apresentaram benefício funcional quando usadas independentemente. Desta forma, gostaríamos de avaliar se a atividade física de alta intensidade aquática associada ao transplante de células tronco da medula óssea também no infarto do miocárdio apresenta este mesmo benefício.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar o efeito funcional do miocárdio e anatomopatológico do transplante de células tronco mononucleares da medula óssea associada à atividade física de alta intensidade aquática pós infarto do miocárdio com disfunção ventricular em ratos Wistar.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar a fração de ejeção, volumes diastólicos e sistólicos finais do ventrículo esquerdo entre o período de sessenta dias após o infarto e seus valores basais.
- Comparar a quantidade de colágeno entre os grupos treinados e não treinados entre o período de sessenta dias após o infarto e seus valores basais.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Anatomia das artérias coronárias em ratos

As artérias coronárias dos ratos podem ser vistas a olho nu em corações intactos como uma fina linha vermelha sobre a superfície do coração, no entanto, não são mais visíveis na autópsia naturalmente. Duas artérias coronárias (direita e esquerda) surgem da aorta e descem para o ápex do coração. A coronária esquerda é predominante e irriga o ventrículo esquerdo com seus ramos. Não existe uma verdadeira artéria circunflexa como é vista em espécies maiores ⁽¹⁵⁾.

Rodrigues, *et al.*, produziram trinta modelos anatômicos de corações de vertebrados com o intuito de estudar as artérias coronárias esquerda e direita de diversas espécies. Um dos mamíferos estudados foi o rato albino da variedade Wistar. A anatomia cardíaca encontrada neste animal evidenciou dois átrios, dois ventrículos, valvas atrioventriculares e aorta saindo do ventrículo esquerdo; a anatomia coronariana apresentou artéria coronária direita emergindo de óstio próprio, dirigindo-se para a margem direita do ventrículo direito, com seu ramo interventricular posterior, e a artéria coronária esquerda emergindo de óstio próprio, bifurcando-se, em seguida, em artéria circunflexa e artéria interventricular anterior com ramo diagonal ⁽¹⁶⁾.

4.2 Modelos experimentais de Infarto agudo do miocárdio (IAM) através da ligadura da artéria coronária

Johns e Olson realizaram um estudo experimental sobre infarto agudo do miocárdio induzido por ligadura da artéria coronária esquerda em roedores de pequeno porte, identificando de imediato, mudanças na coloração e da contratilidade do ventrículo esquerdo. O mesmo procedimento foi realizado em cachorros, no entanto com uma taxa de sobrevivência menor e com áreas de infarto com pouca extensão. Outro dado importante encontrado foi a quase ausência de arritmia ventricular grave pós-infarto agudo do miocárdio em roedores, apresentando apenas um caso dentre mais de duzentos que se reverteu após massagem cardíaca. Em contrapartida, os cachorros apresentaram uma alta incidência de arritmia ventricular grave com pouca tolerância à interrupção do fluxo coronariano (15)

Seguindo o modelo de Johns e Olson, outros autores como Mill, Stefanon *et al.*, Pfeffer, Pfeffer *et al.*; Leor, Patterson *et al.*; Liu *et al.* realizaram o infarto agudo do miocárdio em ratos através da ligadura da artéria coronária esquerda. O procedimento é realizado através de uma toracotomia lateral esquerda após anestesia geral e obtenção de uma via aérea definitiva. O pericárdio é aberto, as artérias coronárias visualizadas e então o infarto é induzido através da ligadura da artéria coronária esquerda com fio de sutura 7-0. A região infartada é visualizada de imediato pela diferença de coloração e alteração de contratilidade do ventrículo esquerdo.

Após este último procedimento, o tórax é fechado por camadas e o animal é extubado ^(15, 17-20).

Liu, *et al.*, realizaram um estudo com 78 ratos nos quais foi ligada a artéria coronária esquerda para a indução da insuficiência cardíaca congestiva. Onze por cento dos animais faleceram nas primeiras vinte e quatro horas, nove por cento de 24h há seis meses (mortalidade total de 20%) e apenas 3% dos animais não apresentaram sinais de infarto agudo do miocárdio. Pesou os corações dos animais infartados na primeira e segunda semana pós-ligadura, no primeiro, segundo, terceiro, quarto e sexto mês, sendo que só houve diferença significativa da massa cardíaca a partir do primeiro mês em diante. Com os dados citados acima, adicionados de parâmetros ecocardiográficos, os autores identificaram disfunção ventricular e desenvolvimento de dilatação do ventrículo esquerdo já na primeira semana, apresentando piora progressiva da função do ventrículo esquerdo e dilatação do mesmo entre o primeiro e segundo mês ⁽²¹⁾.

Degabriele, *et al.*, fizeram um estudo com 46 camundongos com peso variando de 20-25g (6-10 semanas de vida). Dividiram os animais em quatro grupos: 1º- IAM com sutura alta (proximal), ou seja, o ramo descendente anterior da coronária esquerda foi ligado na junção atrioventricular; 2º- sutura média (0,3mm da junção atrioventricular); 3º- sutura baixa (0,6mm da junção atrioventricular) e 4º- grupo controle (animais sem intervenção). Não encontraram diferença na sobrevida em 7 dias nos animais do grupo controle, sutura baixa e média apresentando as sobrevidas de 100%, 90% e 73% respectivamente. Todavia, houve baixa sobrevida nos

animais do grupo da ligadura alta com sobrevida de 33% (67% de mortalidade). Concluíram que a oclusão da artéria coronária descendente anterior 0,3mm distal a junção atrioventricular reproduz uma redução significativa da função ventricular com baixa mortalidade ⁽²²⁾.

A oclusão da artéria coronária nesses animais tem um grande impacto na disfunção ventricular, podendo variar de alteração mínima a falência ventricular esquerda, sempre dependendo do tamanho do infarto ⁽²³⁾.

4.3 Fisiopatologia

Modelos de animais pós-infarto têm sido amplamente estudados, pois a isquemia miocárdica e o infarto agudo do miocárdio são causas freqüentes de insuficiência cardíaca (IC) em humanos. No entanto, nem todos os corações pós-infarto evoluem para IC, pois já é demonstrado que a dilatação do ventrículo esquerdo ocorre apenas em grandes infartos transmuralis ⁽²⁴⁾.

Nos infartos miocárdicos transmuralis em ratos, Hochman e Bulkley, relataram que a extensão do infarto não estava relacionada apenas com o tamanho, mas também com o tempo de evolução, não havendo mudanças estruturais nos primeiros dois dias após o infarto, mostrando alterações na estrutura celular em 65% dos animais infartados do quinto ao sétimo dia pós-ligadura ⁽²⁵⁾. Em contrapartida, Pfeffer *et al.*, evidenciaram mudanças estruturais (aumento de volume) já nas primeiras 4-6 horas após a ligadura

da coronária em 51% dos ratos com grandes infartos e em 41% dos ratos com moderados infartos ⁽²⁴⁾.

A remodelação pós-infarto pode ser dividida em uma fase precoce (primeiras 72 horas) e uma fase tardia (após 72 horas). A fase precoce envolve a expansão da zona de infarto, ao qual pode resultar em ruptura ventricular ou formação de aneurisma, enquanto a fase de remodelação tardia envolve o ventrículo esquerdo (VE) como um todo, ou seja, dilatação do VE, modificação da forma ventricular e hipertrofia da parede do ventrículo ⁽²⁶⁾. Mudanças adaptativas do ventrículo pós-infarto incluem dilatação, hipertrofia e formação de fibra colágena. A remodelação ventricular pode continuar por semanas ou mesmo meses, até que exista um contrabalanço entre as forças de distensão e a formação de colágeno. O balanço é determinado pelo tamanho do infarto, localização, se é ou não transmural, patência ou não da artéria infartada e fatores locais ⁽²⁷⁾.

A função do VE infartado não é apenas dependente da contratilidade do músculo viável, mas também da capacidade de formação de tecido fibrótico na área necrosada, sendo ambos os processos tempo dependentes ⁽¹⁷⁾.

Em infartos miocárdicos induzidos de moderada a grande extensão, pode haver mudanças significativas de pressão, volume, massa e fração de ejeção, ao contrário dos ratos que evoluem com infarto de pequena extensão ⁽³⁶⁾. Em moderados e grandes infartos induzidos do ventrículo esquerdo, há um processo inflamatório, desenvolvimento de edema e aumento do peso do ventrículo, ao qual retorna a valores normais após

hipertrofia compensatória do miocárdio residual. Durante a resolução da resposta inflamatória, ocorre dilatação do ventrículo esquerdo independente do tamanho da área infartada. Após a cicatrização completa da área afetada, ratos com pequenos infartos não evoluem com aumento da câmara cardíaca, processo ao qual é demonstrado em moderados e grandes infartos, nos quais apresentam dilatação de suas câmaras. Com a resolução da resposta inflamatória aguda e a formação de tecido cicatricial, a massa ventricular cai progressivamente para níveis quase normais no sétimo e décimo nono dia pós-infarto, retornando a valores de base no centésimo sexto dia após o IAM, reflexo do mecanismo compensatório do miocárdio residual ^(24,28).

Após o infarto do miocárdio, os cardiomiócitos da região afetada são gradativamente substituídos por tecido fibrótico com perda da função contrátil regional. O remodelamento ventricular resulta em um afinamento da parede podendo formar um aneurisma de ventrículo esquerdo, além de insuficiência cardíaca. A disfunção miocárdica é primariamente causada pela perda dos cardiomiócitos ⁽²⁹⁾

Anversa, *et al.*, descreveram que a hipertrofia do ventrículo direito após infarto do ventrículo esquerdo pode ser atribuída a dois fatores: a estimulação mecânica desencadeada pela hipertensão pulmonar e a ativação do sistema neuro-hormonal sistêmica ou local ⁽³⁰⁾.

Bolognese e Cerisano demonstraram que a hipertrofia compensatória do ventrículo esquerdo e direito não se deve apenas ao estímulo mecânico da elevação da pré-carga ou da pós-carga. Estímulos

mecânicos locais via estiramento e ativação de mecanotransdutores, associados à reação inflamatória decorrente de necrose dos miócitos, promovem a liberação de fatores de crescimento que estimulam a hipertrofia e fibrose ⁽³¹⁾.

As mudanças patológicas que ocorrem após a ligadura da artéria coronária em rato têm sido muito estudadas. O remodelamento ventricular desenvolvido após o IAM em ratos é similar ao que acontece com o humano ⁽⁴⁵⁾. Inicialmente ocorre uma diminuição da espessura da parede ventricular da área infartada, enquanto há uma hipertrofia das paredes não afetadas em resposta ao aumento de estresse, importante processo adaptativo de ambos os ventrículos na manutenção da função mecânica do ventrículo esquerdo. Ratos com menos de 20% de área infartada tem pouca ou nenhuma alteração hemodinâmica. Entretanto, animais com grandes infartos desenvolvem aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo, mesmo que numa avaliação inicial nas três primeiras semanas não haja mudanças na função e na complacência do músculo não afetado. Todavia após seis semanas de IAM há uma disfunção contrátil, perda da complacência ventricular, hipertrofia dos miócitos e aumento das fibras colágenas no miocárdio não infartado, pois as mudanças de pressão e volume estão diretamente relacionadas ao tempo de infarto, podendo o ventrículo esquerdo continuar a dilatar por até um ano após a isquemia ⁽³²⁾.

Epifanio, *et al.*, realizaram um estudo com 35 ratos Wistar machos sobre a remodelação miocárdica após infarto agudo do miocárdio. O IAM acompanhou-se de hipertrofia do ventrículo esquerdo e direito, indicando

que o crescimento muscular foi altamente compensatório. A análise estatística mostrou que os pesos médios dos ventrículos corrigidos pelos pesos corporais (VE/PC), foram menores nos grupos tratados com medicação do que no grupo controle quando comparados ao grupo com infarto agudo sem tratamento. O infarto agudo levou a um aumento da massa ventricular direita. Houve aumento estatisticamente significativo da fração do colágeno intersticial do ventrículo esquerdo do grupo não tratado em relação aos grupos controle e tratados com medicações, concluindo que a remodelação miocárdica pós-infarto é caracterizada pelo aumento da massa ventricular remanescente e aumento de colágeno intersticial. Outro dado importante demonstrado por este autor foi que, dependendo do tamanho da área infartada, a medida do peso do ventrículo tende a subestimar a presença da hipertrofia ventricular. Em vigência de infarto agudo do miocárdio, a medida da área celular do miócito é o melhor índice para hipertrofia do músculo cardíaco. Descreveu também um aumento de fibrose intersticial em áreas remotas ao infarto pela medida de fração do colágeno do ventrículo esquerdo ⁽³³⁾.

Mesmo com o avanço dos métodos de diagnóstico e tratamento da insuficiência cardíaca congestiva, ela tem sido uma das doenças cardiovasculares com maior incidência, prevalência e alta mortalidade em nosso meio, sendo o infarto agudo do miocárdio como sua principal etiologia ⁽³⁴⁾.

A insuficiência cardíaca congestiva se caracteriza como uma síndrome clínica complexa na qual o coração encontra-se impossibilitado de

fornecer um débito cardíaco adequado para as necessidades do organismo ou só consegue fazê-lo em condições de elevada pressão de enchimento. Pode-se dividir a insuficiência cardíaca como crônica e aguda. A caracterização como aguda relaciona-se com o modo de instalação, rápido ou súbito, geralmente apresentando-se como edema pulmonar agudo, choque cardiogênico ou combinação de ambos. A insuficiência cardíaca crônica secundária a um infarto agudo do miocárdio é uma das mais sérias e importantes doenças, sendo que tais pacientes são responsáveis por 50% dos candidatos para transplante cardíaco ⁽³⁵⁾.

4.4 Avaliação da quantificação do IAM em modelos experimentais

Scorsin, *et al.* propuseram estudo com o objetivo de analisar se o número de células mioblásticas transplantadas no miocárdio de ratos infartados poderia influenciar na melhora da função ventricular esquerda. Realizaram uma toracotomia lateral esquerda e induziram o infarto do miocárdio com a ligadura da artéria coronária esquerda em 44 ratos. Três dias após o infarto do miocárdio foi realizado estudo ecocardiográfico bidimensional para avaliar a função do ventrículo esquerdo, quantificando desta maneira a extensão do infarto. Obtiveram uma variante muito grande. Dez dos animais com fração de ejeção (FE <25%), dezessete entre 25-35%, nove entre 35-40% e oito considerados normais (FE>40%).⁽³⁶⁾

Com o objetivo de uma aplicabilidade clínica do transplante celular, compararam o transplante de cardiomiócitos fetais e de mioblastos em corações de ratos infartados, procuraram identificar qual tipo de transplante apresentaria uma melhor recuperação da função ventricular esquerda, após infarto do miocárdio em 42 ratos através da ligadura da coronária esquerda. A análise ecocardiográfica para avaliação da função ventricular esquerda foi realizada no quarto dia e um mês após o IAM, tanto no grupo controle (infarto apenas) como no grupo com transplante de células. Os resultados mostraram melhora da FE dos corações do grupo tratado com cardiomiócitos fetais e do grupo tratado com células mioblásticas, pois os valores variaram de 39 para 45% e de 40 para 47%. Nos animais do grupo controle houve um decréscimo do mesmo parâmetro avaliado, 40 para 36%.⁽³⁶⁾

Guarita-Souza, *et al.*, fizeram um estudo sobre transplante de células tronco mesenquimais e células mioblásticas esqueléticas com cultura isolada e em conjunto, usando como modelo experimental 72 ratos Wistar com peso aproximado de 400g. Para avaliação de parâmetros funcionais, utilizou a ecocardiografia transtorácica bidimensional, usando como parâmetro principal a fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Nos animais do grupo controle (IAM por ligadura com FE<40) houve uma diferença significativa da FE entre o 7º e 30º dia de pós-infarto. No entanto, obteve melhora significativa da FE apenas nos animais com transplante de células musculares isoladas ou em co-cultura⁽³⁷⁾.

De Pasquale, *et al.*, quantificaram o infarto agudo do miocárdio através da planimetria do total da circunferência infartada sobre a circunferência total do ventrículo esquerdo. Para a aferição destes dados, os corações foram dissecados e separados o ventrículo esquerdo do direito. O ventrículo esquerdo foi preservado em formaldeído e quatro cortes transversais foram realizados para a aferição das circunferências. Foram classificados como: ausência de infarto (0% do ventrículo esquerdo), pequeno (até 25% do ventrículo esquerdo), moderado (25-45% do ventrículo esquerdo), e grande (acima de 45% do ventrículo). Dos trinta e nove ratos estudados, a análise histológica mostrou que quinze dos animais não infartaram, sete ratos apresentaram grande infarto e dezessete ratos com infarto moderado ⁽²⁸⁾.

4.5. Células mononucleares

4.5.1. Origem

Durante o desenvolvimento embrionário, os diferentes tipos de células são determinados, dando origem a um organismo multicelular complexo. No período após o crescimento, as células podem limitar a sua capacidade proliferativa com certas restrições moduladas e sua característica específica permanece possivelmente fixada na expressão gênica. A proliferação celular ocorre, mas não mais com a eficiência e rapidez de um organismo embrionário ou fetal. A maioria das células-tronco

adultas mantêm a mesma taxa de proliferação e caráter especializado, mesmo transferindo-a em um novo ambiente. Porém, as células especializadas podem retomar um potencial proliferativo, mas de forma limitada. Em um tecido adulto, surgem freqüentemente células diferenciadas devido a continua renovação celular, originárias de duas fontes: formar-se pela simples duplicação de células diferenciadas, que se dividem para dar outras células filhas do mesmo tipo; ou elas podem ser geradas a partir de células-tronco relativamente indiferenciadas por um processo que envolve situações pouco conhecidas apresentando um direcionamento do seu fenótipo celular para um fenótipo semelhante ao tecido que sofreu injúria ⁽³⁾.

Estas células-tronco são encontradas na maioria dos órgãos, mas o local mais freqüente é o sangue da medula óssea, e dentre este a medula óssea da crista ilíaca é a região preferencial de coleta, devido ao volume maior de sangue e fácil acesso ⁽³⁹⁾.

4.5.2. Classificação

As células-tronco apresentam notada capacidade de originar tecidos a partir de sua forma indiferenciada. Estas células em seus sítios passam do estado quiescente, diferenciando-se em tipos celulares diversos quando necessário. Existem dois tipos de células-tronco: as células-tronco embrionárias e as células-tronco adultas. As células-tronco embrionárias originam da massa celular interior do blastocisto (do 4^o ao 5^o dia) nos

estágios iniciais de desenvolvimento e apresentam capacidade de compor todos os tecidos, incluindo as células germinativas e tecido placentário, possuindo um grande potencial de transformação, consideradas totipotentes ⁽⁴⁰⁾.

As células-tronco adultas são pluripotentes e surgem na fase tardia da embriogênese e do desenvolvimento fetal. Podem fornecer cópias idênticas delas mesmas por longo período de tempo ou podem também dar origem a vários tipos celulares maduros que possuam características especializadas. Sua função é manter o estado de homeostase do organismo e dos tecidos, preservando as suas funções, através da reposição de células destruídas por lesões ou doenças ⁽³⁹⁾.

As células-tronco oriundas do cordão umbilical são também consideradas adultas, pois são retiradas do recém nascido a termo; no entanto com o diferencial de uma capacidade proliferativa maior do que as células-tronco adultas de um indivíduo adulto, porém podem apresentar potencial de teratogenicidade ⁽⁴¹⁾.

4.5.3 Células-tronco da Medula Óssea

As células mononucleares da medula óssea apresentam linhagens celulares distintas tendo funções específicas: as células-tronco hematopoiéticas, células progenitoras endoteliais e células-tronco não hematopoiéticas ⁽⁴²⁾.

As células-tronco hematopoiéticas de (1-2%) apresentam a função de dar origem a componentes do sangue. Já as células progenitoras endoteliais apresentam função de secretar diversos fatores de crescimento endotelial, promovendo angiogênese nos tecidos patológicos. As células-tronco não hematopoiéticas demonstram grande plasticidade e aderência nos frascos de cultivo e foram primeiramente descritas como células estromais, mas muito recentemente elas têm sido designadas como células-tronco mesenquimais (<0,05%), porque é delas a capacidade para diferenciação para linhagens mesodermas: miogênicas, osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas ^(55, 56). Além disto, as células-tronco mesenquimais são capazes de diferenciar em células não mesenquimais incluindo células do fígado e células da glia. Muito recentemente, foram observadas células-tronco de medula óssea se diferenciando em células neuronais “*in vitro*” ⁽⁴³⁻⁴⁵⁾.

Diferenças importantes ocorrem entre as células-tronco mesenquimais e as hematopoiéticas. Embora estes dois tipos celulares são de fácil obtenção *in vitro* e seus isolamentos são realizados por gradiente de concentração, as células-tronco mesenquimais apresentam alta capacidade de aderência em superfícies plastificadas, o que ajuda na distinção destas células ^(39, 46).

Uma das considerações que deve ser feita também é a propriedade que as células-tronco mesenquimais apresentam de se diferenciarem de meio para meio. Assim, revela-se a importância da implantação no microambiente. A aparente transdiferenciação das células-tronco deve ter

dois caminhos: a célula funde com células do parênquima, ou então as células-tronco apresentam específica função de diferenciação ⁽⁴⁶⁾.

As extensas pesquisas referentes às células-tronco oriundas da medula óssea projetam seus benefícios na regeneração tecidual, principalmente na formação de novos vasos sanguíneos, o que motiva pesquisadores a realizar pesquisas experimentais e clínicas na tentativa de efetivar seu uso nas terapias de diversas doenças ⁽⁴⁷⁾.

4.5.4. Uso Terapêutico: Reparo do Miocárdio

Grande parte das pesquisas básicas e descobertas sobre células-tronco foram realizadas em modelos animais, principalmente em camundongos. Em 1867, o patologista Cohnhein sugeriu pela primeira vez a existência de células não hematopoiéticas na medula óssea. Anos após, em 1970, Friedenstein e colaboradores consolidaram a hipótese, demonstrando a capacidade de aderência das células estromais da medula óssea, cultivadas em frascos de plásticos, e que estas células aderentes possuíam pluripotencialidade e rápida diferenciação em tecidos mesenquimais ⁽³⁹⁾.

Estudos “*in vitro*”, demonstram que células-tronco da medula óssea diferenciam-se em cardiomiócitos, quando extraídas de ratos e colocadas em cultivo. Sob cultura observou-se formação de miotubos e contração espontânea, após adição de 5-azactidina ⁽⁴⁸⁾.

Embora controverso, estudos realizados utilizando células da medula óssea demonstraram a ocorrência de diferenciação cardiomiogênica

das células-tronco da medula óssea quando transplantadas bem como sua sobrevivência e efeitos funcionais do tecido miocárdio após infarto ⁽⁴⁹⁾.

O transplante de células cultivadas ou não em tecidos cardíacos lesados tem sido proposto como uma alternativa para tratamento de insuficiência cardíaca, principalmente pós-infarto, limitando a extensão do tecido cicatricial ⁽⁵⁰⁾.

Uma das possibilidades sugeridas é que o transplante de células-tronco pluripotentes, as quais têm potencial de multiplicação e diferenciação em células contráteis e células endoteliais na cicatriz do infarto, promovam uma angiogênese e uma capacidade de regeneração tecidual ⁽⁵¹⁾.

Os resultados levaram a crer que, na medula óssea, tanto precursores hematopoiéticas quanto os mesenquimais são capazes de promover regeneração cardíaca. Podem ser obtidas por punção medular ou isoladas do sangue periférico. Diferentes modos têm sido propostos e utilizados para promover a chegada de células-tronco no miocárdio, tais como: injeção intravenosa periférica, injeção intracoronária e injeção intramiocárdica; além da mobilização de angioblastos autólogos da medula óssea por citocinas e diversos fatores de crescimento (fator de estimulação macrófago-granulócito-GM-CSF, fator de célula tronco-SCF, fator de estimulação de colônia de granulócitos-G-CSF, unidade formadora de colônia-fibroblasto-CFU-F) para auxiliar na revascularização do miocárdio. A terapia celular em conjunto com terapias tradicionais, oferece potencial de melhora aos pacientes ⁽⁵²⁾.

4.6 Exercício físico na Insuficiência Cardíaca

Os benefícios cardiovasculares, metabólicos e autonômicos após o exercício agudo ou crônico têm levado muitos investigadores a sugerir o treinamento físico como uma conduta não farmacológica importante no tratamento de muitas patologias, dentre elas a insuficiência cardíaca⁽⁵³⁾.

O treinamento físico induz adaptação significativa em uma ampla variedade de capacidades funcionais relacionadas ao transporte e à utilização do oxigênio, produz melhoras significativas na capacidade para o controle respiratório no músculo esquelético que contém mitocôndrias maiores e mais numerosas, além do aumento da atividade das enzimas oxidativas. A atividade aumentada das enzimas β -oxidação e um melhoramento generalizado do potencial oxidativo das fibras musculares tornam possível a maior utilização dos lipídeos⁽¹²⁾.

Pacientes com disfunção ventricular esquerda – fração de ejeção inferior a 20%, denominada doença cardíaca em estágio terminal, sugere um prognóstico a longo prazo extremamente precário. Apesar de alguns pacientes assintomáticos e minimamente sintomáticos poderem mostrar uma função quase normal e sobreviverem por vários anos, a maioria dos pacientes sintomáticos falece dentro de um ano após ter sido feito o diagnóstico. Para esses pacientes a reabilitação cardiopulmonar passa a constituir uma esperança de sobrevivência⁽⁵⁴⁾.

O exercício físico realizado de maneira regular produz aumento no volume plasmático, além da redução de algumas proteínas plasmáticas,

como fibrinogênios e globulinas, processo definido como hemodiluição crônica. A adesão e a agregação plaquetária ficam atenuadas com o exercício crônico. Da mesma forma fatores pró coagulantes como o fibrinogênio, se manifestam de forma menos intensa nos indivíduos ativos⁽¹²⁾.

O treinamento físico pode provocar alterações neurovegetativas e cardiovasculares importantes, em humanos e animais. Desta forma foram observados diminuição do estresse oxidativo e diminuição da hipertrofia cardíaca⁽²⁰⁾. Estudos experimentais relatam que o treinamento físico se mostrou eficaz em reverter às alterações de frequência cardíaca, pressão arterial, além de melhorar a função contratil do coração destes animais⁽⁵⁵⁾.

O aumento da massa cardíaca e teor de água pulmonar em animais com grandes infartos do miocárdio foram atenuados quando esses foram submetidos a treinamento físico por natação, sugerindo que a realização de exercício físico pode atenuar os indicadores de insuficiência cardíaca (IC) e contribuir para remodelamento cardíaco favorável. A redução da capacidade de realizar exercícios em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (IC) está diretamente relacionada com as alterações pulmonares decorrentes da congestão pulmonar: redução da capacidade vital e dos fluxos de ar e prejuízo das trocas gasosas.⁽⁵⁶⁾.

Em geral, a congestão pulmonar que ocorre nos cardiopatas depende de elevação da pressão venosa pulmonar como resultado de aumento da pressão de enchimento do ventrículo esquerdo (VE), conseqüente à disfunção crônica do VE. Em ratos que desenvolvem IC após

infarto agudo do miocárdio (IAM), tal como em humanos, o aumento da pressão de enchimento do VE é secundário à disfunção sistólica e diastólica. A influência do exercício físico sobre o remodelamento miocárdico é motivo freqüente de investigações. Porém, poucos estudos investigaram os efeitos do treinamento físico sobre a congestão pulmonar da IC que se instala após IM.⁽⁵⁷⁾

Bech *et al.* observaram melhora da capacidade de exercício físico e redução da congestão pulmonar em ratos infartados tratados com captopril e coenzima Q10, mas não avaliaram a influência isolada do exercício físico. Libonati verificou que o exercício físico em esteira melhorou a função diastólica de corações isolados pós-IM e considerou que essa influência pode possibilitar a prevenção da congestão pulmonar. Contudo, esse autor não avaliou o conteúdo hídrico dos pulmões⁽⁵⁸⁾.

Levando em conta tais argumentos vários autores têm buscado resultados através do treinamento de ratos infartados e remodelamento cardíaco, o protocolo mais descrito de treinamento físico tem se iniciado na terceira semana após o IM, por ser o período reconhecido como necessário para que a cicatrização do IM se complete.

Leslie *et al* realizaram um estudo onde o foi utilizado o protocolo de exercício em conformidade com *American Physiological Society* onde estabelece o protocolo de exercício em Animais com treinamento em piscina, sendo este iniciado quatro semanas após a oclusão coronária, utilizando um recipiente com água da torneira (80 cm de profundidade) mantidos a 32-34 °C por aquecimento elétrico. A água foi mantida em

contínua turbulência para fornecer o exercício contínuo. Para o protocolo de adaptação dos animais, o treinamento foi limitado a 10 minutos do primeiro dia e um aumento de 10 minutos cada dia até o sexto dia. O treinamento foi realizado por um período total de oito semanas, 60 minutos por dia e cinco dias por semana ⁽⁵⁹⁾.

Segundo Leslie *et al*, os benefícios gerados pela prática regular, repetida e adequadamente intensificada do exercício físico resultam das interferências neuro-humorais que são despertadas durante a atividade física e que se sustentam durante parte, ou todo o período, dos intervalos das sessões de treinamento. Adicionalmente, interferências do exercício físico sobre o coração promovem aprimoramento da função mecânica miocárdica por ação, entre outras, sobre os canais de cálcio do sarcolema, o conteúdo de cálcio do retículo sarcoplasmático, a bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático a fosfolambam, a proteína trocadora sódio-cálcio, e a responsividade dos miofilamentos ao cálcio ⁽⁵⁹⁾.

Segundo Peter Gaudron *et al*, que utilizaram 156 ratos que foram randomizados após oclusão coronária ou operação simulada para permanecer sedentários ou para começar a nadar com quatro dias de treinamento ou 21 dias depois oclusão coronária, que foi continuado durante oito semanas (seis dias por semana, 90 minutos por dia). Não tiveram uma sobrevivência influenciada por infarto ou exercício sozinho. Em ratos com infartos pequenos, o volume do VE e forma e de sobrevivência em longo prazo não foi alterada pelo exercício crônico iniciado cedo ou mais tarde após a ligadura da artéria coronária. A mortalidade aumentou nos animais

com enfarte grande como resultado de exercício ($P < .0001$) e foi 47,6% com o exercício precoce e 26,7% com o exercício final ($P < .05$, precoce versus tardia). Tamanho do infarto em ratos com o exercício antecipado ($48\% \pm 3$) foi semelhante em comparação com tamanho do infarto de ratos com o exercício final ($46\% \pm 2$, $P = NS$ comparado com o exercício antecipado). O exercício não afetou disfunção do VE (avaliada por sistólica e diastólica final e dP / dt_{max})⁽⁶⁰⁾.

Byung-Hee *et al.* relataram ter sido, inconsistente os efeitos do exercício sobre a remodelação do VE após a oclusão coronária permanentes. Embora os protocolos experimentais e tipos diferentes de exercícios, os efeitos do exercício sobre o remodelamento do VE após a reperfusão coronariana, especialmente na zona de infarto, não tenham sido avaliadas. As alterações histopatológicas depois do infarto do miocárdio ocorrem aproximadamente duas vezes mais rápido em ratos como em humanos, com cura completa e formação de cicatriz em três semanas após o infarto⁽⁶¹⁾.

O exercício em piscina após a oclusão coronária permanente em ratos pode induzir o afinamento da parede infartada, mas, a parede infartada não era mais fina no grupo exercitado reperfundidos do que nos grupos sedentários reperfundidos. Exercício em ratos normais pode aumentar o volume da câmara esquerda, e uma tendência ($p = NS$) em direção a um aumento área da cavidade com o exercício foi observado na operação simulada animais; área da cavidade do VE foi significativamente aumentada em exercício no grupo reperfundidos comparados com os do exercício

operação simulada. A última descoberta é provavelmente relacionada ao fato de que a área da cavidade do VE foi significativamente maior no grupo sedentário reperfundidos do que no grupo de cirurgia simulada sedentário. No entanto, a uma tendência a uma maior área de cavidade no grupo reperfundidos submetido ao exercício comparado com o sedentário reperfundidos, entretanto sem diferença estatisticamente significativa⁽⁶¹⁾.

5. MATERIAL E MÉTODO

A pesquisa foi realizada no Centro de Cirurgia e Diagnóstico do Laboratório Experimental de Técnica Cirúrgica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, após ter sido aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (registro no CEUA / PUCPR nº 434), com animais provenientes do biotério da PUCPR, segundo os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal⁽⁶²⁾.

Foram utilizados 21 ratos Wistar machos (260-300g). Os ratos foram mantidos agrupados e armazenados em gaiolas de polipropileno em ambiente com temperatura controlada (22°C – 24°C) e com luz controlada sob ciclos claro/escuro (12/12h) e água *ad libitum*.

Todos os animais foram submetidos ao infarto do miocárdio. Após sete dias os mesmos foram submetidos à análise ecocardiográfica e os animais que apresentavam fração de ejeção abaixo de 35% foram incluídos no estudo. Neste momento os animais foram randomizados e divididos em quatro grupos experimentais a seguir relacionados:

Grupo I Infartado sem exercício (sedentário) SD sem - Os animais foram acompanhados por 60 dias – n (05)

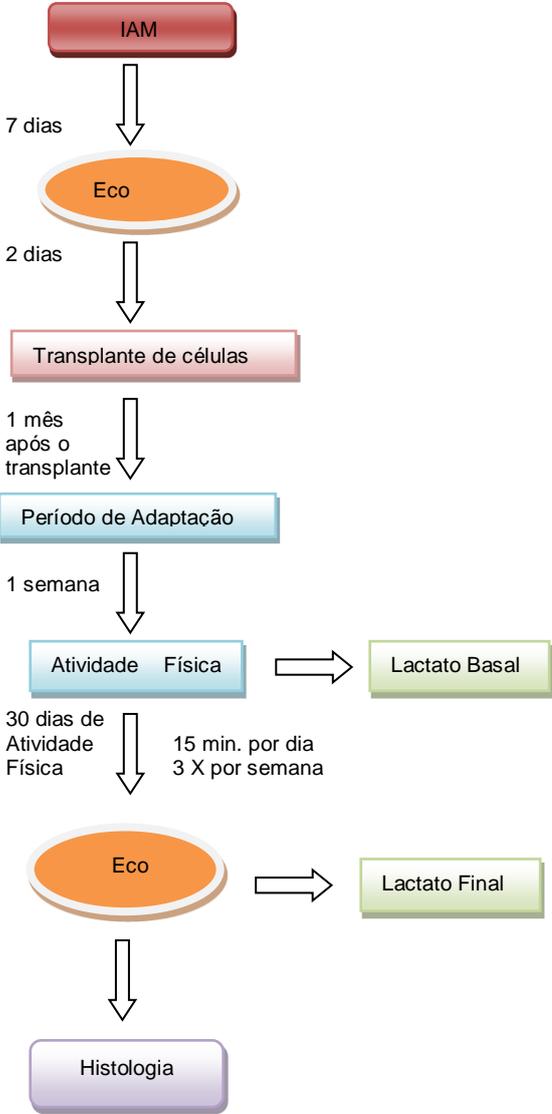
Grupo II Infartado sem exercício (sedentário) com células SD com. – Os animais foram transplantados com células mononucleares da medula óssea e acompanhados por 60 dias – n (05)

Grupo III Infartado treinado sem células TR sem- Os animais foram submetidos à atividade física durante 15 minutos, três vezes por semana e acompanhados por 60 dias – n (05)

Grupo IV Infartado treinado com células TR com – Os animais foram transplantados com células mononucleares da medula óssea e submetidos à atividade física durante 15 minutos, três vezes por semana e acompanhados por 60 dias – n (06)

A atividade física teve início trinta dias após o infarto do miocárdio.

5.1. Fluxograma do protocolo de pesquisa



5.2. Anestesia

Todos os ratos do experimento foram submetidos à anestesia geral com a associação de ketamina e xylazina (50mg/kg) por via intramuscular.

5.3. Obtenção de via aérea e ventilação

Após a indução da anestésica observou-se a ausência do reflexo ocular palpebral. Com o relaxamento do animal obteve-se uma via aérea definitiva através da intubação orotraqueal com cateter venoso periférico número 14. Após cada procedimento cirúrgico, certificava-se a patência da via aérea conectando o cateter ao sistema de ventilação mecânica com volume de 2,5ml (O₂/min.) com frequência de 50 ciclos por minuto observando-se a expansão dos pulmões. Foram utilizados dois respiradores a volume (HARVARD®, Inc., respirador modelo 683, Massachusetts, USA) para animais de pequeno porte com oxigênio a 21% (ar ambiente).



(A)

(B)

Figura 1 A e B: A - Animal intubado conectado ao sistema de ventilação mecânica. B – Respirador a volume.

5.4. Posição do animal durante o experimento

Todos os animais foram submetidos à tricotomia na região ventral, no tórax, na porção ventrolateral esquerda, imediatamente antes do procedimento cirúrgico. Posicionou-se em decúbito dorsal com uma leve inclinação para a direita, facilitando desta maneira a exposição da área a ser abordada, fixando os membros anteriores e posteriores com fita adesiva.

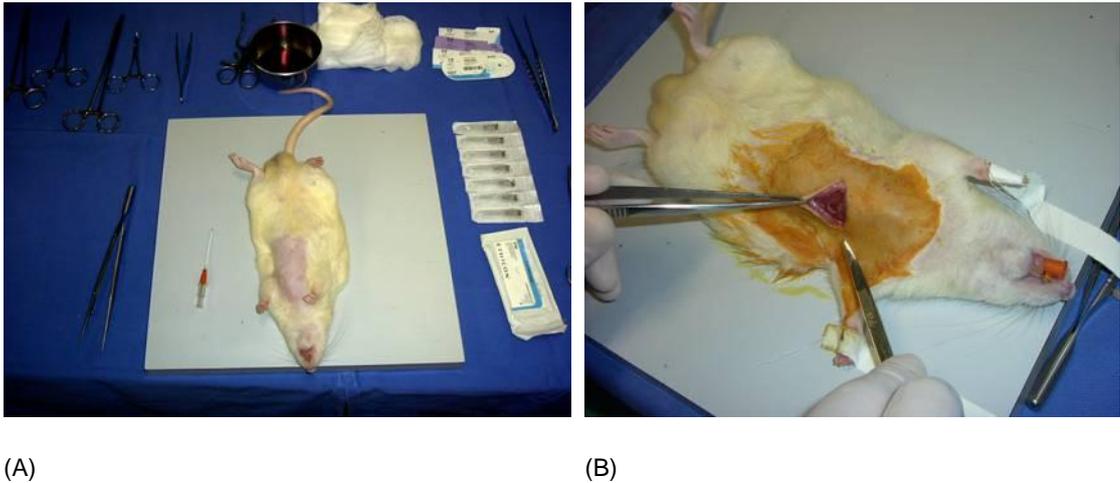


Figura 2 A e B. Posição do animal (A) e início da toracotomia lateral esquerda com 1,5 cm de extensão (B)

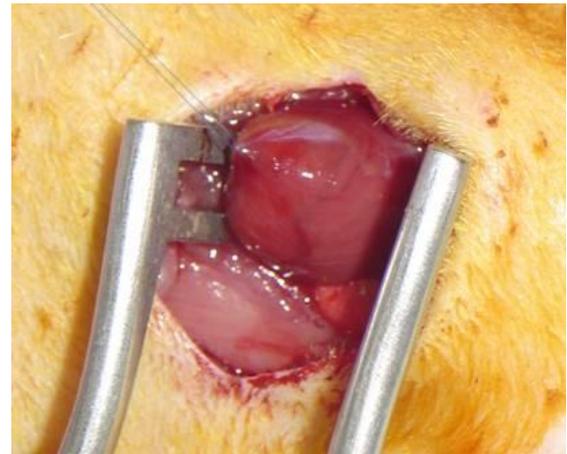
5.5. Descrição do procedimento

Após a anestesia e intubação orotraqueal do rato, foi realizada a anti-sepsia do tórax com iodopovedina tópico e a toracotomia lateral esquerda no terceiro espaço intercostal nos animais. Após a abertura da pleura esquerda, o animal foi conectado ao sistema de ventilação mecânica. O pericárdio foi retirado para a luxação e melhor visualização da área a ser abordada. Após a exteriorização do coração, a aurícula esquerda foi afastada e a artéria coronária esquerda ligada com fio de sutura polipropileno azul monofilamentar não absorvível 7.0 entre a via saída da artéria pulmonar e o átrio esquerdo. A região infartada foi imediatamente visualizada pela diferença de coloração da área afetada. Em seguida, o coração foi reposicionado ao tórax, os pulmões hiperinflados e a parede

torácica suturada por planos com fio de sutura mono-naylon monofilamentar não absorvível 4.0. Após a recuperação da anestesia, os animais foram mantidos em gaiolas, alimentados com ração comercial padrão e livre acesso à água.



(A)



(B)

Figura 3 A e B. Exposição do coração para o procedimento (A) e aspecto do mesmo após a ligadura da coronária esquerda (B).

5.6. Ecocardiografia

Os animais foram analisados com equipamento de ecocardiografia bidimensional modelo Sonos 5500 (Hewlet Packard, USA), com transdutores setorial S12 (5-12 mHz) e linear 15L6 (7-15 mHz).



Figura 4. Aparelho de ecocardiografia bidimensional para animais de pequeno porte.

Todos os animais, independente do grupo a que pertenciam, foram anestesiados com ketamina e xylazina na dose de 25mg/kg e 5mg/kg, via intramuscular, para a realização do exame. Todos os animais foram submetidos á ecocardiografia no 7^o, 30^o e 60^o dias pós-lesão miocárdica com o intuito de acompanhar a evolução do infarto do miocárdio. Todos os animais foram monitorizados nas derivações periféricas com eletrodos pediátricos, obtendo-se a frequência cardíaca com visualização cardioscópica. Colocando o transdutor na porção ventrolateral esquerda da parede torácica, as imagens foram vistas em duas dimensões, e as câmaras

ventriculares visualizadas em dois cortes, o transversal e o longitudinal. No longitudinal se obteve uma visão axial do ventrículo esquerdo incluindo a valva mitral, a valva aórtica, a parede anterior, posterior e o ápice do VE; enquanto na corte transversal, se observou a parede septal, anterior, lateral e posterior na região basal média e apical do ventrículo esquerdo (VE). Os parâmetros que foram: fração de ejeção (FE%), volume diastólico final do VE (VD) e volume sistólico final do VE (VS). As medidas foram obtidas pelo método de Simpson, utilizando o software do computador, tanto na sístole como na diástole. Todas as medidas foram feitas três vezes pelo mesmo observador, tendo como resultado final uma média das três.

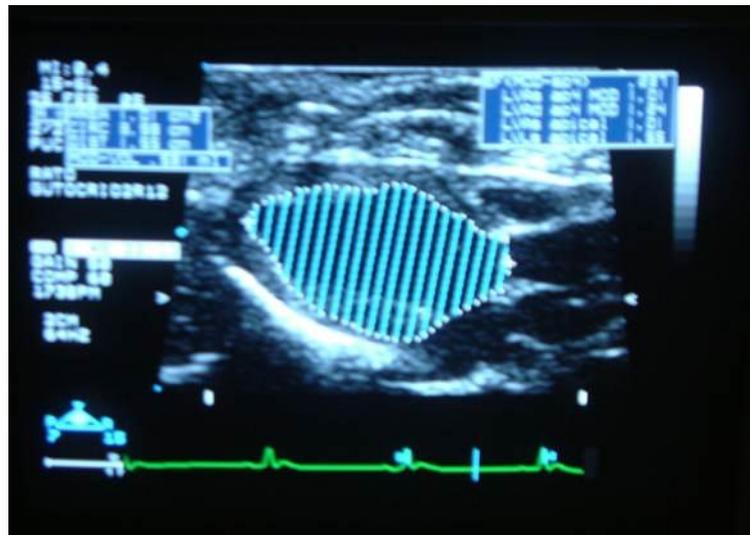


Figura 5. Imagem ecocardiográfica mostrando o volume do ventrículo esquerdo.

5.7. Exercício

5.7.1. Protocolo de adaptação

Atividade física com natação foi realizado em ambiente com temperatura controlada a 30°C, usando uma piscina de 85 de comprimento por 30 de largura por 50 de altura. Os animais foram adaptados, após o infarto do miocárdio, antes do treinamento durante 10 minutos em três diferentes níveis de coluna de água: primeiro dia com 20 cm, segundo dia 30 cm e último dia 40 cm ⁽⁶³⁾.

5.7.2. Protocolo de treinamento

Atividade física com natação ocorreu por trinta dias nos grupos treinados. Os animais se exercitaram durante 15 minutos por dia durante três dias por semana, após 30 dias do infarto. O mesmo tempo foi respeitado para o grupo de animais controle, ou seja, sem exercício ⁽⁶³⁾.



Figura 6. Piscina usada na atividade física dos animais.

5.7.3. Análise sanguínea do lactato

As amostras de sangue (25 μ L) foram coletadas da cauda do animal, para a quantificação do exercício. As coletas foram realizadas em dois períodos: no primeiro dia da atividade física, sendo considerado dados basais e trinta dias após as atividades físicas. Os ratos que se exercitaram foram submetidos ao teste imediatamente antes e depois da atividade física. Foram analisados os grupos treinados com células e sem células. A concentração de lactato foi determinada através do lactímetro portátil (Accutrend). Os grupos sedentários com e sem células (n=10) passaram pela análise da concentração do lactato com objetivo de ampliar o controle da amostra.

5.8. Obtenção do sangue da medula óssea

Para cada animal, a obtenção do sangue da medula óssea foi realizada pelo método de punção-aspiração na medula óssea dos ratos, sempre precedida de anestesia: Ketamina 50mg/Kg e Xilazina 10mg/Kg. Os animais foram colocados em posição de decúbito lateral com a perna superior flexionada e a inferior reta. A punção-aspiração foi realizada na crista ilíaca posterior do fêmur com seringa descartável (BD-Plastipak®) de 5mL, com 0,2 mL de heparina (5.000UI/ mL), com agulha 25X8 21 mm G1 (BD- Precision Glide®); foi coletado cerca de 1mL do sangue da medula óssea de cada rato, seguida de identificação das seringas ⁽⁶⁴⁾.

5.8.1. Isolamento das células da medula óssea, fração mononuclear

As células mononucleares foram obtidas pela técnica de punção-aspiração. Para o isolamento da fração mononuclear utilizou-se o gradiente de densidade ($d=1,077\text{g/m}^3$) (Ficoll-Hypaque -Sigma, St. Louis, MO) de acordo com Böyum, em meio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM-GIBCO BRL) suplementado com 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e 20% de solução tampão. O material coletado de cada rato foi colocado em tubo estéril de centrífuga de plástico de 15 mL. Logo após, completado este tubo até 12ml, com meio de cultura IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media), suplementado com solução tampão 4% e

antibiótico (penicilina e streptomina) 1% e homogeneizado. Em um tubo de plástico de 15mL, foi colocado 3mL de solução de separação por gradiente de densidade (d: 1,077) (Ficoll-Hypaque) e logo em seguida colocado neste tubo o homogeneizado contendo a medula óssea do animal e meio de cultura IMDM, cuidadosamente para que esta não se misturasse ⁽⁶⁴⁻⁶⁵⁾.

Este tubo foi levado à centrífuga e submetido a 1400rpm rotações por minuto durante 40 minutos à 22°C. Logo após, levado a fluxo novamente, e retirado o anel formado entre o meio e o gradiente.

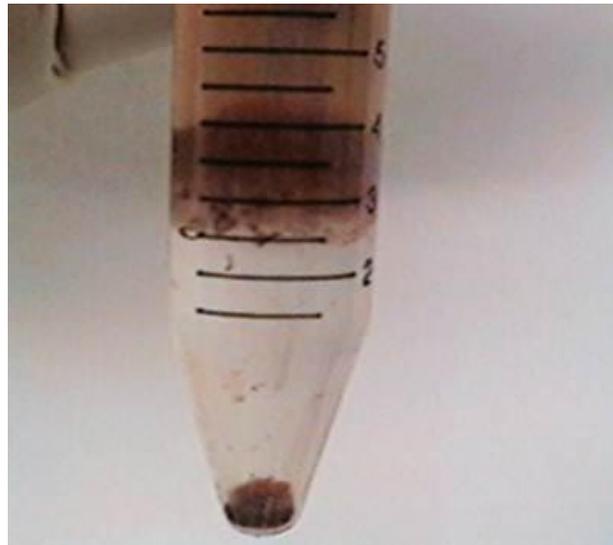


Figura 7. Anel formado de células-tronco mononucleares

Este homogeneizado foi retirado, onde se encontravam as células-tronco mononucleares, foram colocados em outro tubo de plástico de 15mL. Foi completado com meio IMDM até 15mL e centrifugado novamente por 1500rpm por 10 minutos a 22°C. Retirado da centrifuga o tubo, foi realizado um descarte rapidamente do sobrenadante. Observam-se um precipitado no

fundo do frasco, sendo este as células-tronco mononucleares. Repetida a etapa anterior e colocando 13mL de meio no tubo, foi res-suspendido o precipitado e centrifugado novamente a 1500rpm, por mais 10 minutos a 22°C. Após esta fase, foi descartado o sobrenadante, colocado 3mL de meio no tubo, ressuspendido as células, para contagem destas. Esta contagem foi realizada em câmara de Neubauer e lida em microscópio óptico Olympus® CX31 em objetiva de 40X ⁽⁶⁴⁾.

5.8.2 Transplante das células

As células derivadas da medula óssea, fração mononuclear foram suspensas no IMDM, contendo 20% de soro bovino fetal (SBF, Gibco BRL, Grand Island, NY) e 1% de antibiótico (100µg/mL de penicilina e 100µg/mL estreptomicina). O implante foi realizado sete dias após a o infarto agudo do miocárdio na área de transição da parede anterior do ventrículo esquerdo. A infusão foi de 15 µL de células na concentração de 5×10^6 usando seringa de Hamilton (1701 LT, Hamilton Bonaduz AG).

5.9. Eutanásia

Todos os animais que foram submetidos à eutanásia receberam a dose letal (DL50) (148 mg/kg) do anestésico ketamina. ⁽⁶⁶⁾ As amostras enviadas para análise anatomo-patológica.

5.10. Estudo anatomo-patológico

Os corações foram preservados em frascos contendo formol 10% durante 24 horas. Após este período os corações foram clivados em 4 partes iguais transversais no micrótomo (Leica modelo RM2145) com espessura de 5 μ m.

Realizado a desidratação dos cortes, sendo estes submetidos a banhos sucessivos em álcool 70%, 80%, 90%, 3 banhos em álcool 100% no (Leica modelo TP1020), durante 1 hora. Logo após, impregnada parafina líquida nos cortes através de 3 banhos a 65°C no mesmo aparelho. Então os cortes histológicos foram montados em lâminas e corados com solução de H&E e Picro Sirius Red. De cada fragmento foram realizadas duas lâminas com os quatro cortes e com as colorações citadas.

5.10.1. Análise Morfométrica

Realizou-se análise morfométrica, isto é, objetiva no sexagésimo dia após o infarto, uma vez que os marcadores estavam direcionados para fase crônica da cicatrização. Foi realizada a análise do colágeno corando-se os cortes histológicos pela técnica de Hematoxilina-Eosina e examinou-se em microscopia óptica. Examinaram-se as lâminas com conhecimento da identificação conhecida, em microscópio óptico (Olympus®BX40), aumento de 200 X, acoplado a uma câmera Sony® e a um computador. Utilizou-se um software um programa de análise de imagens digitais *Image Pro-plus®* for Windows.

Capturaram-se as imagens das lâminas para o computador, e com auxílio do programa *Image pro-plus®* mediam-se as áreas selecionadas e de interesse.

Com a ferramenta “conta gotas” selecionaram-se os objetos de interesse e o programa automaticamente gerou a medida. Uma vez que a área total do exame era constante, selecionou-se a estatística do programa que fornecia o percentual da área ocupada pelo objeto do estudo, ou seja, o colágeno.

Mediram-se dez campos por cortes histológicos em cada lâmina na área do infarto obtendo-se então, uma média da leitura daqueles cortes.

5.11. Análise Estatística

Para comparar os momentos pré e pós dentro de cada grupo, foi usado o teste t de Student para amostras pareadas. Para a comparação dos grupos em relação aos resultados da avaliação pré, foi usado o modelo de análise de variância (ANOVA) com um fator. Para a comparação dos grupos em relação aos resultados da avaliação pós e em relação às diferenças entre pré e pós, foi usada a análise de covariância, considerando-se a medida pré e o resultado de lactato como covariáveis. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram organizados em planilha Excel e analisados com o uso do programa computacional Statistica v.8.0.

6. RESULTADOS

6.1. Análise ecocardiográfica intra grupo

Na tabela abaixo podemos observar os valores dos grupos com relação a Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo (FEVE), o Volume Sistólico do Ventrículo Esquerdo (VSFVE) e o Volume Diastólico do Ventrículo Esquerdo (VDFVE).

Tabela 1. Comparação dos resultados intra-grupos.

GRUPOS	SEDENTARIOS					
	SEDENTARIOS SEM CELULAS			SEDENTARIOS COM CELULAS		
	PRÉ	PÓS	P	PRÉ	PÓS	P
FEVE (%)	35,20 ± 7,6	22,39 ± 4,56	0,026	25,18 ± 7,73	23,85 ± 9,51	0,860
VSFVE(ml)	0,39 ± 0,15	0,65 ± 0,12	0,020	0,50 ± 0,07	0,98 ± 0,12	0,018
VDFVE(ml)	0,59 ± 0,19	0,83 ± 0,13	0,117	0,89 ± 0,13	1,25 ± 0,20	0,033

GRUPOS	TREINADOS					
	TREINADOS SEM CELULAS			TREINADOS COM CELULAS		
	PRÉ	PÓS	P	PRÉ	PÓS	P
FEVE (%)	21,49 ± 2,70	20,71 ± 7,14	0,792	29,85 ± 6,68	33,43 ± 7,56	0,246
VSFVE(ml)	0,50 ± 0,09	0,64 ± 0,05	0,014	0,61 ± 0,14	0,59 ± 0,22	0,872
VDFVE(ml)	0,70 ± 0,14	0,82 ± 0,09	0,058	0,71 ± 0,13	0,73 ± 0,06	0,776

Com relação à Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo (FEVE) identificou-se uma diminuição deste parâmetro nos grupos Sedentário sem e com Células e no grupo Treinado sem células. Com relação ao grupo Treinado com Células identificou-se um aumento deste parâmetro no

período entre sessenta dias após o infarto do miocárdio e seus valores basais.

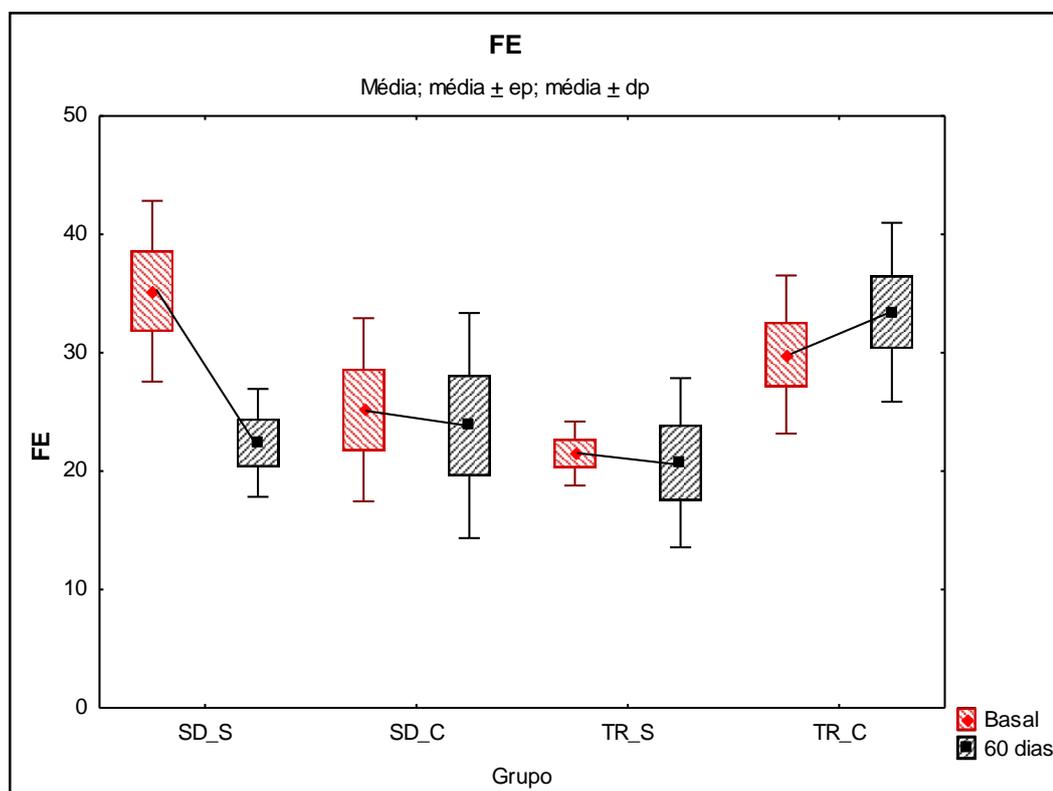


Figura 8. Gráfico da Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo.

Com relação ao Volume Sistólico Final do Ventrículo Direito (VS) identificou-se um acréscimo deste parâmetro nos grupos Sedentário sem e com Células e no grupo Treinado sem células. Com relação ao grupo Treinado com Células identificou-se uma diminuição deste parâmetro.

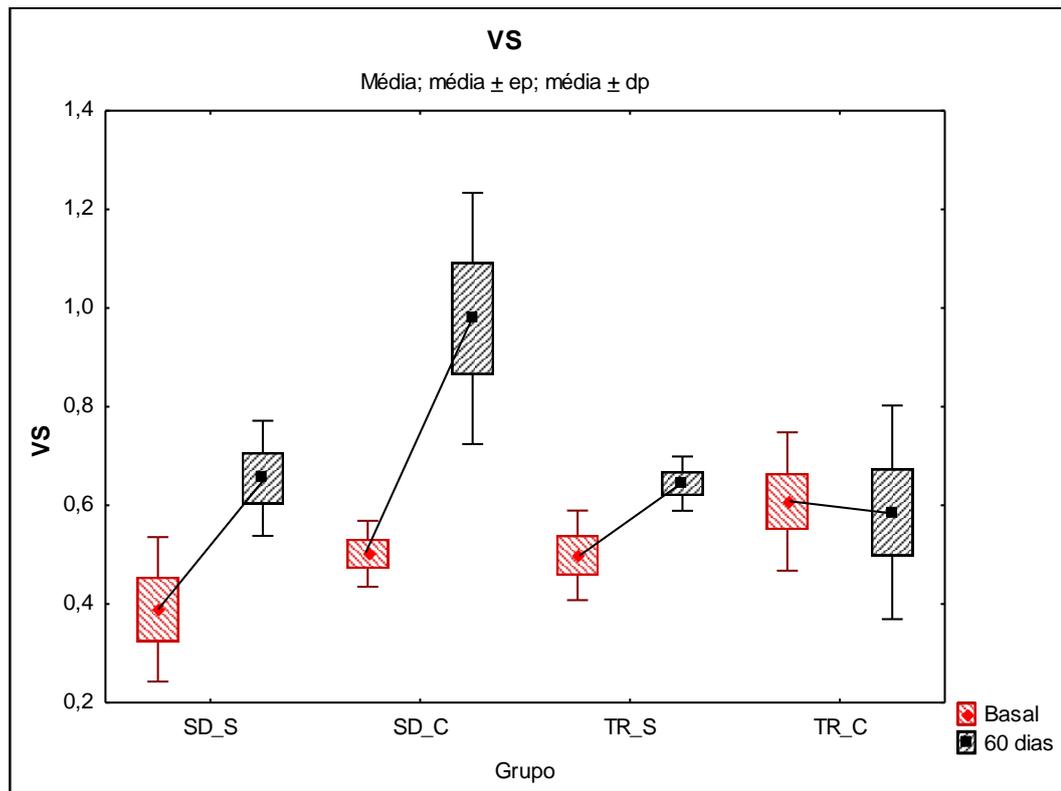


Figura 9. Gráfico do Volume Sistólico Final do Ventrículo Direito

Com relação ao Volume Diastólico Final do Ventrículo Esquerdo (VD) identificou-se um acréscimo deste parâmetro nos quatro grupos estudados: Sedentário sem e com Células e Treinado sem e com Células.

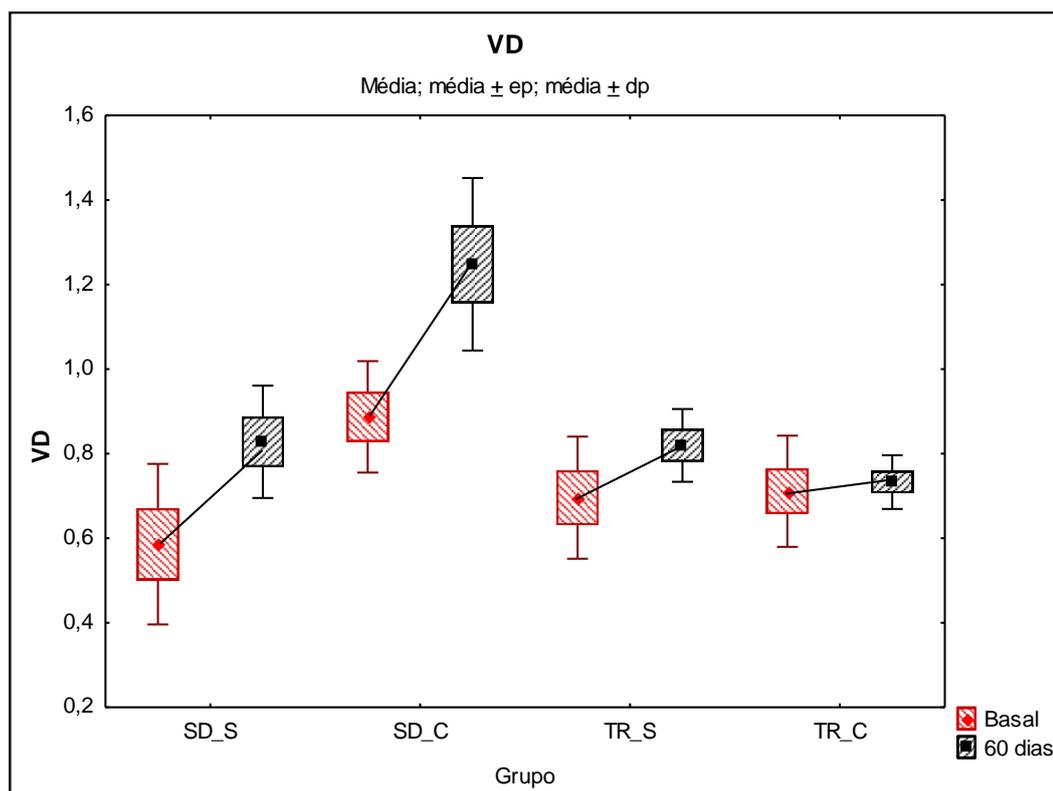


Figura 10. Gráfico do Volume Diastólico Final do Ventrículo Esquerdo

6.2. Análise ecocardiográfica inter grupos

Comparando-se os quatro grupos entre si, foi identificada diferença estatisticamente significativa dos valores ecocardiográficos trinta dias após o infarto do miocárdio nos parâmetros de fração de ejeção e volume diastólico final do ventrículo esquerdo. Desta forma os animais não foram considerados homogêneos.

Com relação ao parâmetro da FE nos dados de base identificou-se que os grupos não eram homogêneos ($p=0.022$), desta forma foi utilizada uma análise de covariância. Quando analisados os resultados em 60 dias após o infarto do miocárdio, identificou-se uma diferença estatisticamente significativa apenas quando se compararam os grupos Sedentários sem células com os Treinados com células ($p=0.031$) e os grupos Treinados com e sem células ($p=0.015$).

Tabela 2. Valores ecocardiográficos trinta dias após o infarto do miocárdio nos parâmetros de fração de ejeção e volume diastólico final do ventrículo esquerdo.

Comparação dos grupos dois a dois	Pré	Pós
SD sem x SD com	0,027	0,767
SD sem x TR sem	0,004	0,734
SD sem x TR com	0,194	0,031
SD com x TR sem	0,384	0,526
SD com x TR com	0,254	0,057
TR sem x TR com	0,050	0,015

Com relação ao parâmetro do VDF logo após o infarto do miocárdio identificou-se que os grupos não eram homogêneos ($p=0.040$) desta forma foi utilizada uma análise de covariância. Quando analisados os resultados em 60 dias observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Sedentário com e sem células ($p<0.001$), Sedentário com células e Treinado sem células ($p<0.001$) e Sedentário e Treinado com células ($p<0.001$).

Tabela 3 Relação ao parâmetro do VDP logo após o infarto

Comparação dos grupos dois a dois	Pré	Pós
SD sem x SD com	0,006	<0,001
SD sem x TR sem	0,264	0,913
SD sem x TR com	0,187	0,212
SD com x TR sem	0,060	<0,001
SD com x TR com	0,070	<0,001
TR sem x TR com	0,868	0,253

Com relação ao parâmetro do VSF logo após o infarto do miocárdio identificou-se que os grupos eram homogêneos ($p=0.052$). Após sessenta dias observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Sedentários com e sem células ($p= 0.008$), Sedentário com células e Treinado sem células ($p=0.007$) e Sedentário e Treinado com células ($p=0.002$).

Tabela 4. Relação ao parâmetro do VSF após sessenta dias do infarto

Comparação dos grupos dois a dois	Pré	Pós
SD sem x SD com	0,0052	0,008
SD sem x TR sem	0,0052	0,921
SD sem x TR com	0,0052	0,511
SD com x TR sem	0,0052	0,007
SD com x TR com	0,0052	0,002
TR sem x TR com	0,0052	0,579

6.3 Análise do Lactato

Os valores obtidos após a dosagem de lactato seguem nas tabelas abaixo.

Tabela 5. Comparação dos resultados intra-grupos. Valores de lactato basal e 30 dias após a atividade física.

GRUPOS	SEDENTARIOS					
	SEDENTARIOS SEM CELULAS			SEDENTARIOS COM CELULAS		
	PRÉ	PÓS	P	PRE	PÓS	P
FEVE (%)	35,20±7,64	22,39±4,56	0,026	25,18±7,73	23,85±9,51	0,860
VSFVE(ml)	0,39±0,15	0,65±0,12	0,020	0,50±0,07	0,98±0,12	0,018
VDFVE(ml)	0,89±0,19	0,83±0,13	0,117	0,89±0,13	1,25±0,20	0,033
Lactato (mmol)	2,50	3,28	x	4,28	3	x

GRUPOS	TREINADOS					
	TREINADOS SEM CELULAS			TREINADOS COM CELULAS		
	PRÉ	PÓS	P	PRÉ	PÓS	P
FEVE (%)	21,49±2,71	20,71±7,41	0,792	28,86±6,68	38,43±7,56	0,246
VSFVE(ml)	0,50±0,09	0,64±0,05	0,014	0,61±0,14	0,89±0,22	0,872
VDFVE(ml)	0,7±0,14	0,82±0,09	0,058	0,71±0,13	0,73±0,06	0,776
Lactato (mmol)	3,70	3,40	x	4,50	5,98	X

Os resultados apresentados nesta tabela demonstram que apesar do grupo treinado com células apresentar uma insuficiência cardíaca grave não houve piora da mesma, sugerindo uma estabilização do remodelamento ventricular, confirmado pelos valores de VSFVE (Volume Sistólico Final do

Ventrículo Esquerdo), e de VDFVE (Volume Diastólico Final do Ventrículo Esquerdo), neste mesmo grupo.

O resultado de lactato em repouso demonstrou que não houve a melhora aeróbia esperada pelo exercício.

Tabela 6. Valores de lactato em comparação dois a dois nos períodos basal e após trinta dias de atividade física.

COMPARAÇÃO DOIS A DOIS	FEVE- valores p		VDFVE valores de p		VSFVE valores de p		LACTATO valores de p	
	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS	PRÉ	PÓS
SD sem X SD com	0,027	0,76	0,006	0,001	0,0052	0,008	0,009	0,76
SD sem X TR sem	0,004	0,73	0,26	0,91	0,0052	0,92	0,065	0,87
SD sem X TR com	0,19	0,03	0,18	0,21	0,0052	0,51	0,003	0,007
SD com X TR sem	0,38	0,52	0,06	0,001	0,0052	0,007	0,354	0,66
SD com X TR com	0,25	0,005	0,07	0,001	0,0052	0,002	0,710	0,003
TR sem X TR com	0,05	0,05	0,86	0,25	0,0052	0,57	0,187	0,09

Foram encontradas diferenças significativas quando comparados o grupo sedentário sem células com o grupo sedentário com células. Essas alterações são verificadas principalmente pela piora do grupo sedentário sem células, quando comparados aos outros grupos. Isto demonstra que a terapia celular combinada com atividade física resultou na manutenção da função cardíaca.

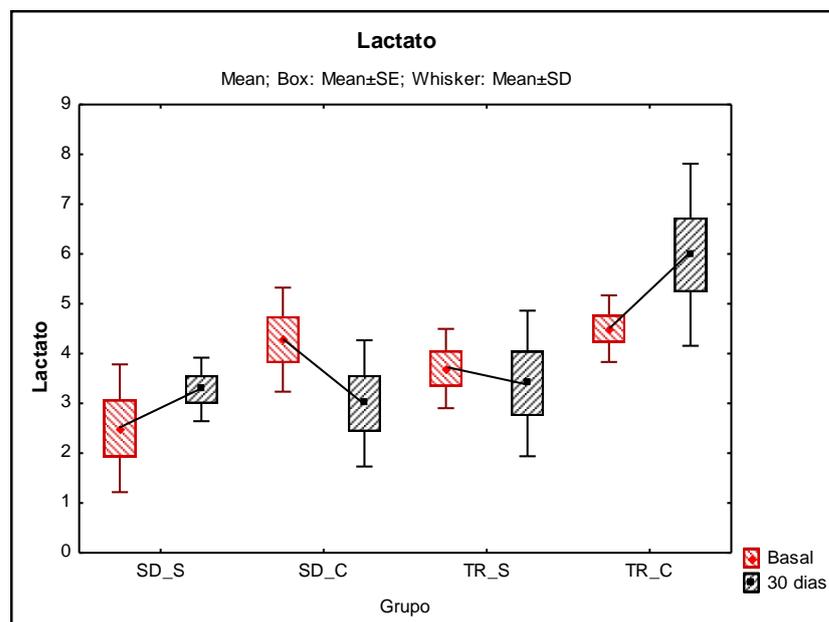


Figura 11. Variação dos valores de lactato entre o período entre o período basal e 30 dias após a atividade física.

6.4 Anatomia patológica

6.4.1 Análise do colágeno

Com relação à análise do colágeno na área do infarto, os resultados em 60 dias observa-se que houve diferença estatisticamente significativas entre os grupos treinado com e sem células, como é possível identificar na tabela e gráficos abaixo.

Tabela 7. Valores de colágeno, na área no infarto

Variável	Grupo	n	Média	Desvio padrão	Valor de p
Área IAM	SD sem cel	5	4,2	3,8	<0,001
	SD com cel	5	4,2	2,5	
	TR sem cel	5	9,7	2,7	
	TR com cel	6	3,8	3,5	

Tabela 8. Valores de colágeno, na área no infarto, comparação dois a dois

Comparação dos grupos dois a dois	
SD sem x SD com	0,993
SD sem x TR sem	<0,001
SD sem x TR com	<0,001
SD com x TR sem	<0,001
SD com x TR com	<0,001
TR sem x TR com	0,007

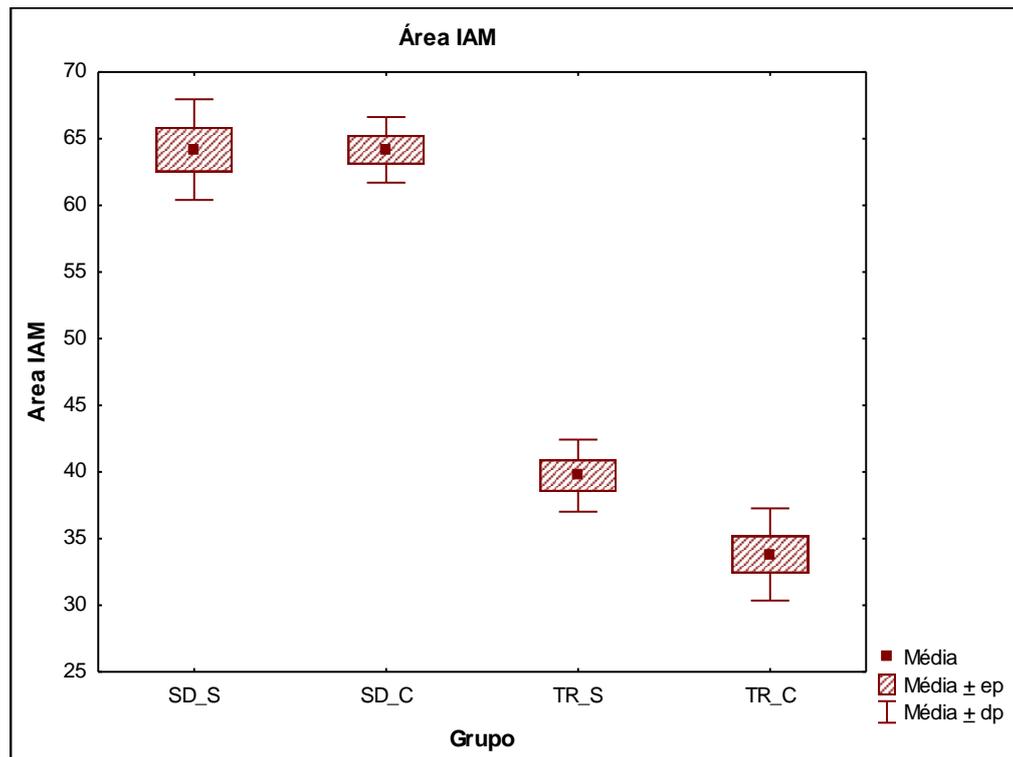


Figura 12. Valores do colágeno na área do infarto

7. DISCUSSÃO

O transplante de células tronco mononucleares da medula óssea na cardiomiopatia isquêmica vem sendo realizado com resultados que sugerem uma melhora funcional do miocárdio, principalmente pelo seu mecanismo de angiogênese no local do transplante. A atividade física também apresenta um potencial de vasodilatação regional nas regiões próximas ao infarto, o que possibilita uma melhora da perfusão do miocárdio infartado e também uma recuperação global da função do ventrículo esquerdo. Estas duas opções de tratamento vêm sendo aplicadas em pacientes com insuficiência cardíaca associada. Neste estudo foi utilizado em um modelo experimental semelhante, pois foram incluídos animais com fibrose estabelecida e disfunção ventricular esquerda severa.

A associação destas duas terapias neste trabalho sugeriu um ganho adicional quando utilizadas em conjunto, como foi possível de ser identificada ao analisamos a fração de ejeção do ventrículo esquerdo e os mecanismos de remodelamento ventricular pós infarto.

Com relação à análise funcional no período pré-transplante, os quatro grupos apresentaram os parâmetros da fração de ejeção e volume diastólico final do ventrículo esquerdo com diferença estatística entre si, desta forma os parâmetros de FE e VD foram analisados como co-variância, na tentativa de homogeneizar os mesmos.

O grupo controle, ou seja, sedentário sem células apresentou uma deterioração importante de fração de ejeção do ventrículo esquerdo após sessenta dias do infarto do miocárdio comprovando o efeito da necrose muscular e como consequência a insuficiência cardíaca, o que já era de se

esperar. Foi identificada uma pequena queda da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, tanto no grupo sedentário com células como no grupo treinado sem células, sugerindo uma estabilização da função cardíaca. Esta estabilização pode ser justificada pelo próprio benefício da atividade física no grupo treinado e pela ação das células tronco mononucleares da medula óssea no grupo sedentário.

Com relação ao grupo treinado com células identificou-se um benefício funcional, que pode ser justificado pela ação tanto das células tronco mononucleares como da atividade física. Na comparação entre os grupos sedentário sem célula (controle) com treinado com células este resultado é evidente. Entretanto, na comparação entre os grupos treinado com e sem células também foi identificado um benefício no grupo com células sugerindo que o benefício das células tronco mononucleares da medula óssea possa ter sido mais significativo.

Analisando-se apenas os animais que foram submetidos à atividade física, ou seja os treinados, identificou-se que os animais que receberam as células tronco mononucleares da medula óssea apresentaram um efeito protetor do miocárdio em relação aos animais que não receberam células. É verdade que quando analisado o parâmetro da fração de ejeção do ventrículo esquerdo intra grupo, mesmo no grupo treinado sem células, houve uma estabilização da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, pois um decréscimo de 21,49% para 20,71% é considerado irrelevante. Desta forma sugere-se o efeito protetor da atividade física neste modelo.

Quando analisamos os animais sedentários, observou-se que os animais que não receberam células podem ser considerados grupo controle, pois os mesmos foram infartados, não praticaram atividade física e também não receberam células. No grupo sedentário que recebeu células identificamos uma diminuição da FE de 25,18% para 23,85%, variação também considerada sem significância, sugerindo um mecanismo protetor miocárdico das células transplantadas.

Com relação ao volume diastólico final do ventrículo esquerdo, os quatro grupos estudados, apresentaram um aumento dos seus valores após sessenta dias do infarto. No grupo controle, em consequência de deterioração da função ventricular pós-infarto, já havia uma previsão que ocorreria um remodelamento ventricular. Entretanto, o grupo sedentário com células apresentou uma dilatação de ventricular estatisticamente significativa, o que também foi identificado em um estudo publicado pelo mesmo grupo ⁽⁶⁷⁾. Com relação ao grupo treinado com células apesar da dilatação ventricular identificada, considerou-se que houve uma estabilização do remodelamento ventricular.

Com relação ao volume sistólico final do ventrículo esquerdo, os grupos sedentários com e sem células e o grupo treinado sem células apresentaram um aumento dos seus valores neste mesmo período, sugerindo uma perda da capacidade contrátil, entretanto no grupo treinado com células identificou-se uma diminuição deste parâmetro. Apesar de não ter sido significativa, sugere-se uma capacidade de proteção funcional do tratamento combinado proposto.

Como foram incluídos no estudo animais com fração de ejeção inferior a 35% e como já existia uma disfunção ventricular severa com aumento dos volumes ventriculares, previamente ao transplante, é difícil de compreender que o transplante de células possa exercer um mecanismo anti-remodelamento, pois o tratamento é apenas regional. Acredita-se que o benefício da atividade física associado possa justificar estes resultados.

De acordo com Ferraz *et al* a insuficiência cardíaca não deve ser considerada como um doença simples e pura, mas sim como uma síndrome complexa que envolve: disfunção endotelial, alteração da composição das fibras musculares estriadas esqueléticas periféricas, anormalidades do fluxo sanguíneo e do controle quimiorreflexo ventilatório. Todas estas alterações resultam em uma menor tolerância ao exercício e em uma menor capacidade funcional⁽⁶⁸⁾.

Guimarães *et al*, descreveram sobre os efeitos limitantes ao exercício em pacientes portadores de insuficiência cardíaca destacando o comportamento de quimiorreceptores centrais e periféricos. Nestes pacientes ocorre um aumento da sensibilidade em quimiorreceptores periféricos que resulta em maior ativação do sistema nervoso simpático aumentando a pressão arterial, a ventilação e a resistência vascular periférico. Este fenômeno é descrito como mecanoreflexo. Além disso, durante a realização de exercícios pacientes portadores de insuficiência cardíaca apresentam uma precoce fadiga muscular ventilatório, que resulta em uma maior demanda de estímulos aferentes ao sistema nervoso central pelas fibras do nervo frênico ativando o sistema nervoso simpático

desencadeando vasoconstrição periférica e menor tolerância ao exercício⁽⁶⁹⁾. Este fenômeno foi descrito por Dempsey *et al* 2000 como metaborreflexo.

Em decorrência do mecanorreflexo e do metaborreflexo ocorre uma alteração na composição das fibras musculares periféricas de pacientes portadores de insuficiência cardíaca. De acordo com Schulze *et al*, pacientes portadores de insuficiência cardíaca sofrem atrofia das fibras tônicas, em decorrência da redução do número de mitocôndrias e mioglobinas presentes nestas fibras por consequência da menor circulação sanguínea permitida pelo aumento da resistência vascular periférica. Assim sendo, as fibras musculares tipo II (fásicas) passam a ser mais ativadas, sendo a glicólise anaeróbia a principal forma de fornecimento de energia para a realização de movimentos, resultando em maior acidose láctica e em menor tolerância ao exercício. Desta forma, portadores de insuficiência cardíaca tendem a apresentar maior produção de lactato em repouso quando comparado a pacientes sem disfunção ventricular. Este comportamento é similar em ratos⁽⁷⁰⁾.

O exercício aeróbio e ou o treinamento muscular ventilatório reduzem os efeitos provocados pelo metaborreflexo e pelo mecanorreflexo. Chiappa *et al* 2006 demonstraram que indivíduos que fizeram treinamento muscular ventilatório reduziram a resistência vascular periférica melhorando a perfusão em decorrência de um melhor condicionamento diafragmático e inibição da ação do sistema nervoso simpático. Ferraz *et al* 2006 demonstraram que pacientes treinados aerobicamente apresentam similar resposta⁽⁷¹⁾.

Na tabela 4 pode-se observar que somente os ratos sedentários que receberam células e os que treinaram sem células reduziram seus valores de repouso (-1,28 e -0,30 respectivamente). O que chama atenção é que os ratos que receberam células e treinaram aumentaram o lactato de repouso, o que pode ser um sinal de que neste grupo os efeitos provocados pelo metaborreflexo e pelo mecanorreflexo não foram controlados. A diferença entre os valores de lactato de repouso antes e após 30 dias de atividade física foi significativa com $p= 0,019$, porém é importante ressaltar que em dois grupos houve aumento nos valores de repouso.

Na tabela 5 os grupos foram comparados dois a dois. Foram encontradas diferenças significativas quando comparados o grupo sedentário sem células com o grupo sedentário com células. Este resultado sugere uma readaptação ao sistema oxidativo de fontes de energia das fibras musculares periféricas do grupo que recebeu células. Outra diferença significativa foi encontrada entre o grupo sedentário que recebeu células e o que foi treinado com células. Esta diferença foi significativa uma vez que o valor de lactato de repouso dos ratos sedentários que receberam células reduziu enquanto que o dos que foram treinados aumentou. Isto demonstra favorável adaptação periférica das fibras dos ratos que receberam células enquanto que no grupo que recebeu treinamento não houve melhora da perfusão sanguínea periférica.

A tabela 5 apresenta os dados comparativos entre o período pré e pós-treinamento onde não se observa diferenças significativas entre os valores encontrados, o que demonstra que para este grupo de animais o

método de treinamento prescrito não surtiu os efeitos esperados, conforme os obtidos por Bacurau *et al* 2009.

Isto pode ter acontecido, pois o grupo de animais treinou durante o período em uma intensidade acima do limiar de lactato, ou limiar anaeróbio. Ferraz *et al* demonstraram que pacientes submetidos a treinamento de baixa intensidade (intensidade equivalente ao limiar anaeróbio) apresentaram melhora da capacidade aeróbia superior aqueles pacientes que treinaram em alta intensidade (próximo ao ponto de compensação ventilatório).

Entre os diferentes métodos não-invasivos utilizados para prever a resposta do lactato sanguíneo durante o exercício, a potência crítica (PC) (para a bicicleta ergométrica ou ergômetro de braço) e a velocidade crítica (corrida e natação) têm apresentado elevados índices de correlação com a intensidade correspondente a 4mM de lactato sanguíneo e com a *performance* aeróbia. Teoricamente, a velocidade crítica é definida como sendo a mais alta intensidade de exercício que pode ser mantida por longo período de tempo sem exaustão⁽⁷²⁾.

O nível do consumo de oxigênio acima do qual a produção de energia aeróbia é suplementada por mecanismos anaeróbios durante o exercício, resultando em um aumento sustentado na concentração de lactato e na acidose metabólica. O limiar anaeróbio é afetado por fatores que modificam a liberação do oxigênio aos tecidos; é baixo em pacientes com doença cardíaca.

Um fator limitante deste estudo foi o fato de não ter sido determinado o ponto de limiar de lactato ou fase estável de exercício. Assim sendo os

ratos podem ter sido treinados constantemente em anaerobiose, o que pode ter resultado em pequena melhora da tolerância ao exercício ou níveis de lactato em repouso. Sugere-se que os ratos que compuseram a amostra deste estudo foram treinados, porém os efeitos esperados do exercício não foram totalmente atingidos.

Por meio da técnica da análise morfométrica foram feitas avaliações quantitativas do colágeno nos corações após sessenta dias do infarto do miocárdio. O principal resultado deste estudo com relação análise do colágeno na área do infarto foi observada uma quantidade significativamente menor nos grupos treinado com e sem células, sendo mais evidente no grupo treinado com células. Acredita-se que os fatores liberados devido ao efeito parácrino das células tronco possam promover uma redução da área de fibrose sugerindo uma recuperação da função ventricular esquerda, que pode ser corroborada com a melhora da fração de ejeção do ventrículo esquerdo e a limitação do remodelamento ventricular. Estes dois mecanismos podem também ser explicados pelo potencial angiogênico das células tronco mononucleares da medula óssea, previamente descritos em outros trabalhos e pelos mecanismos de vasodilatação produzido pela atividade física ⁽⁶⁷⁾

Um estudo realizado por Ferraz *et al* em 2008 demonstrou que após injeção direta de células-tronco mesenquimais em coração isquêmicos de ratos promoveu um decréscimo da fibrose, apoptose e dilatação ventricular esquerda, além de aumentar a espessura da parede miocárdica. ⁽⁶⁸⁾

Um estudo realizado por Xu *et al* demonstrou que em ratos infartados e treinados, após atividade física precoce, a fração de colágeno no grupo treinado foi significativamente menor no grupo sedentário sugerindo que o treinamento físico precoce pós infarto reduz a expressão de metaloproteinases. No presente estudo, o treinamento físico aquático foi realizado pós infarto, melhorando a tolerância ao esforço e a função cardíaca, reduzindo a expressão do colágeno. Esses resultados sugerem que o treinamento físico com auxílio das células tronco mononucleares da medula óssea melhorou a capacidade física e a função desses animais.

8. CONCLUSÕES

Com base no estudo realizado podemos concluir que após sessenta dias do infarto do miocárdio, observou-se que o transplante de células tronco da medula óssea associada à atividade física aquática proporcionou:

- Uma manutenção da função ventricular esquerda no grupo treinado com células, com tendência de melhora da fração de ejeção do ventrículo esquerdo e uma limitação do remodelamento ventricular.
- Com relação ao volume diastólico final do ventrículo esquerdo apesar da dilatação ventricular, considerou-se que houve uma estabilização do remodelamento ventricular.
- Sugere-se uma melhora da capacidade de proteção funcional do tratamento associado de células tronco com o exercício físico, com relação ao volume sistólico final do ventrículo esquerdo.
- Uma melhor recuperação da região infartada no grupo treinado com células, justificada pela menor quantidade de colágeno nesta região.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. DATASUS. Estatísticas Vitais - Mortalidade e Nascidos Vivos. 2007:Acesso em 20/09/2007.
2. Mendez GF, Cowie MR. The epidemiological features of heart failure in developing countries: a review of the literature. *Int J Cardiol*2001 Sep-Oct;80(2-3):213-9.
3. Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*1998 Jul 21;95(15):8801-5.
4. McMurray J, Pfeffer MA. New therapeutic options in congestive heart failure: Part II. *Circulation*2002 May 7;105(18):2223-8.
5. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, et al. [Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction]. *Dtsch Med Wochenschr*2001 Aug 24;126(34-35):932-8.
6. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*2002 Oct 8;106(15):1913-8.
7. Hughes S. Cardiac stem cells. *J Pathol* 2002 Jul;197(4):468-78.

8. Guarita S, Scorsin M, O transplante celular no tratamento da insuficiência cardíaca/ Cell transplantation in the therapy for heart failure Rev Bras Cir Cardiovasc 2001 Sep 16(3): 183-186, ILUS.
9. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). Circulation 2002 Dec 10;106(24):3009-17.
10. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. Lancet 2003 Jan 4;361(9351):45-6.
11. Queen RM, Weinhold PS, Kirkendall DT, Yu B. Theoretical study of the effect of ball properties on impact force in soccer heading. Med Sci Sports Exerc 2003 Dec;35(12):2069-76.
12. MCARDLE WD. ea. Fisiologia do Exercício: Energia, Nutrição e Desempenho Humano. . 2003;5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara.
13. Negrao CE, Middlekauff HR. Exercise training in heart failure: reduction in angiotensin II, sympathetic nerve activity, and baroreflex control. J Appl Physiol 2008 Mar;104(3):577-8.
14. Xu X, Wan W, Ji L, Lao S, Powers AS, Zhao W, et al. Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade limits post-infarct ventricular remodelling in rats. Cardiovasc Res 2008 Jun 1;78(3):523-32.

15. Johns TN, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg*1954 Nov;140(5):675-82.
16. Rodrigues TMA, Palmeira JAO, Mendonça JT, Gomes OM. Estudo evolutivo da anatomia das artérias coronárias em espécies de vertebrados com técnica de moldagem em acetato de vinil. *Rev Bras Cir Cardiovasc*1999;14:331-9.
17. Mill JG, Stefanon I, Leite CM, Vassallo DV. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovasc Res*1990 Sep;24(9):748-53.
18. Pfeffer JM. Progressive ventricular dilation in experimental myocardial infarction and its attenuation by angiotensin-converting enzyme inhibition. *Am J Cardiol*1991 Nov 18;68(14):17D-25D.
19. Liu Y, Leri A, Li B, Wang X, Cheng W, Kajstura J, et al. Angiotensin II stimulation in vitro induces hypertrophy of normal and postinfarcted ventricular myocytes. *Circ Res*1998 Jun 15;82(11):1145-59.
20. Leor J, Patterson M, Quinones MJ, Kedes LH, Kloner RA. Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium? *Circulation*1996 Nov 1;94(9 Suppl):II332-6.
21. Liu YH, Yang XP, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, Carretero OA. Chronic heart failure induced by coronary artery ligation in Lewis inbred rats. *Am J Physiol*1997 Feb;272(2 Pt 2):H722-7.

22. Degabriele NM, Griesenbach U, Sato K, Post MJ, Zhu J, Williams J, et al. Critical appraisal of the mouse model of myocardial infarction. *Exp Physiol* 2004 Jul;89(4):497-505.
23. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979 Apr;44(4):503-12.
24. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol* 1991 May;260(5 Pt 2):H1406-14.
25. Hochman JS, Bulkley BH. Pathogenesis of left ventricular aneurysms: an experimental study in the rat model. *Am J Cardiol* 1982 Jul;50(1):83-8.
26. 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* 1984 Aug;4(2):201-8.
27. Warren SE, Royal HD, Markis JE, Grossman W, McKay RG. Time course of left ventricular dilation after myocardial infarction: influence of infarct-related artery and success of coronary thrombolysis. *J Am Coll Cardiol* 1988 Jan;11(1):12-9.
28. Fletcher PJ, Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Myocardial infarction in experimental hypertension in rats: mechanism of the reduction in blood pressure. *Clin Sci (Lond)* 1980 Dec;59 Suppl 6:385s-7s.

29. Jugdutt BI. Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*2003 Mar;3(1):1-30.
30. Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y, Olivetti G. Myocardial response to infarction in the rat. Morphometric measurement of infarct size and myocyte cellular hypertrophy. *Am J Pathol*1985 Mar;118(3):484-92.
31. Bolognese L, Cerisano G. Early predictors of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Am Heart J*1999 Aug;138(2 Pt 2):S79-83.
32. Gaballa MA, Goldman S. Ventricular remodeling in heart failure. *J Card Fail*2002 Dec;8(6 Suppl):S476-85.
33. Epifanio HB, Zornoff LA, Matsubara BB, de Paiva SA, Inoue RM, Matsubara LS. [Myocardial remodeling after experimental acute myocardial infarction in rats. Effect of renin-angiotensin-aldosterone blockade]. *Arq Bras Cardiol*2005 Jan;84(1):10-4.
34. Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *Am J Med*2001 May 7;110 Suppl 7A:37S-46S.
35. Hayakawa K, Takemura G, Kanoh M, Li Y, Koda M, Kawase Y, et al. Inhibition of granulation tissue cell apoptosis during the subacute stage of myocardial infarction improves cardiac remodeling and dysfunction at the chronic stage. *Circulation*2003 Jul 8;108(1):104-9.

36. Scorsin M, Hagege A, Vilquin JT, Fiszman M, Marotte F, Samuel JL, et al. Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg*2000 Jun;119(6):1169-75.
37. Guarita S, Carvalho KA, Rebelatto C, et al Cell transplantation: differential effects of myoblasts and mesenchymal stem cells *Int J Cardiol.* 2006 Aug 28;111(3):423-9. Epub 2005 Nov 10.
38. De Pasquale CG, Bersten AD, Doyle IR, Aylward PE, Arnolda LF. Infarct-induced chronic heart failure increases bidirectional protein movement across the alveolocapillary barrier. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*2003 Jun;284(6):H2136-45.
39. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*1970 Oct;3(4):393-403.
40. Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev*2005 Apr;85(2):635-78.
41. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res*2005 Oct 15;65(20):9328-37.
42. Chachques JC, Acar C, Herreros J, Trainini JC, Prosper F, D'Attellis N, et al. Cellular cardiomyoplasty: clinical application. *Ann Thorac Surg*2004 Mar;77(3):1121-30.

43. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005 Sep 8;353(10):999-1007.
44. Ye M, Chen S, Wang X, Qi C, Lu G, Liang L, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor in bone marrow stromal cells of rat. *Neuroreport* 2005 Apr 25;16(6):581-4.
45. Deng J, Petersen BE, Steindler DA, Jorgensen ML, Laywell ED. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. *Stem Cells* 2006 Apr;24(4):1054-64.
46. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002 Apr 4;416(6880):542-5.
47. Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Sep 30;100 Suppl 1:11917-23.
48. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999 Mar;103(5):697-705.
49. Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999 Nov 9;100(19 Suppl):II247-56.

50. Fukuda K. Application of mesenchymal stem cells for the regeneration of cardiomyocyte and its use for cell transplantation therapy. *Hum Cell*2003 Sep;16(3):83-94.
51. Fontes PA, Thomson AW. Stem cell technology. Interview by Abi Berger. *BMJ*1999 Nov 13;319(7220):1308.
52. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest*2002 Feb;109(3):337-46.
53. Negrao CE, Rondon MU. Increased mechanoreceptor/metaboreceptor stimulation explains the exaggerated exercise pressor reflex seen in heart failure. *J Appl Physiol*2007 Jan;102(1):499; author reply 504-5.
54. De Angelis K, Leirner AA, Irigoyen MC, Cestari IA. Nonstimulated cardiomyoplasty improves hemodynamics in myocardial-infarcted rats. *Artif Organs*2001 Nov;25(11):939-43.
55. La Rovere MT, Bigger JT, Jr., Marcus FI, Mortara A, Schwartz PJ. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. *Lancet*1998 Feb 14;351(9101):478-84.
56. Dayan A, Feinberg MS, Holbova R, Deshet N, Scheinowitz M. Swimming exercise training prior to acute myocardial infarction attenuates

left ventricular remodeling and improves left ventricular function in rats. *Ann Clin Lab Sci* 2005 Winter;35(1):73-8.

57. Andrews Portes L, Magalhaes Saraiva R, Alberta Dos Santos A, Tucci PJ. Swimming training attenuates remodeling, contractile dysfunction and congestive heart failure in rats with moderate and large myocardial infarctions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009 Apr;36(4):394-9.

58. Bech OM, Sørensen JD, Jensen MK, Diamant B, Steiness E. Effects of long-term coenzyme Q10 and captopril treatment on survival and functional capacity in rats with experimentally induced heart infarction. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990 Oct;255(1):346-50.

59. Leslie WS, Hankey CR, Matthews D, Currall JE, Lean ME.. A transferable programme of nutritional counselling for rehabilitation following myocardial infarction: a randomised controlled study. *Eur J Clin Nutr.* 2004 May;58(5):778-86.

60. 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* 1994 Jan;89(1):402-12.

61. Oh BH, Ono S, Gilpin E, Ross J, Jr. Altered left ventricular remodeling with beta-adrenergic blockade and exercise after coronary reperfusion in rats. *Circulation* 1993 Feb;87(2):608-16.

62. COBEA. Princípios éticos na experimentação animal. Disponível em: [http:// www.cobea.org.br/](http://www.cobea.org.br/). Acesso em maio de 2008.

63. Eldar, and Gania Kessler-Icekson, Sarit Freimann, Mickey Scheinowitz, Daniel Yekutieli, Micha S. Feinberg, Michael. Prior Exercise Training Improves the Outcome of Acute Myocardial Infarction in the Rat. Heart Structure, Function, and Gene Expression. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005;45:931-938
64. Carvalho KA, Cunha RC, Vialle EN, Osiecki R, Moreira GH, Simeoni RB, et al. Functional outcome of bone marrow stem cells (CD45(+)/CD34(-)) after cell therapy in acute spinal cord injury: in exercise training and in sedentary rats. *Transplant Proc* 2008 Apr;40(3):847-9.
65. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968;97:77-89.
66. Reuelto M, Ambros L, Montoya L, Bonafine R. Treatment-time-dependent difference of ketamine pharmacological response and toxicity in rats. *Chronobiol Int* 2002 Sep;19(5):937-45.

67. Guarita S, Carvalho K, REbelatto C, et al, A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio/ Comparison of mononuclear and mesenchymal stem cell transplantation in myocardium infarction Rev Bras Cir Cardiovasc 20(3): 270-278

68. Ferraz, AS; Yazbel-Junior,P; Prescrição do exercício físico para pacientes com insuficiência cardíaca. Revista da Sociedade de Cardiologia do rio Grande do Sul. Ano XV, n 9 set/out/nov/dez 2006:1-13.

69. Guimarães V, Belli J, Bacal F, Bocchi E, Behavior of Central and Peripheral Chemoreflexes in Heart Failure Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; Laboratório de Atividade Física e Saúde do Centro de Práticas Esportivas da Universidade de São Paulo², São Paulo, SP - Brazil

70. Schulze P, Gielen S, Schuler G, et al, C hronic heart failure and skeletal muscle catabolism:effects of exercise training *Universitat Leipzig, Herzzentrum GmbH, Klinik f u"r Innere Medizin/Kardiologie, Russenstr. 19, 04289 Leipzig, Germany International Journal of Cardiology 85 (2002) 141-149*

71. Jianhua Li, Adam N. Sinoway, Zhaohui Gao, Michael D. Maile, Min Pu and Lawrence I. Sinoway Muscle Mechanoreflex and Metaboreflex Responses After Myocardial Infarction in Rats *Circulation* 2004, 110:3049-3054: originally published online November 1, 2004

72. Denadai B. S. Determinação da intensidade relativa de esforço: consumo máximo de oxigênio ou resposta do lactato sanguíneo. Revista Brasileira Atividade Física e Saúde 1999;4:2.