

**JULIANA SILVEIRA DE FREITAS**

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO ASSOCIADO À TERAPIA COM  
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS SOBRE O REMODELAMENTO E  
FUNÇÃO CARDÍACA DE RATOS INFARTADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015**

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

T

F862f  
2015

Freitas, Juliana Silveira de, 1982-

Efeitos do treinamento físico associado à terapia com células-tronco mesenquimais sobre o remodelamento e função cardíaca de ratos infartados / Juliana Silveira de Freitas. – Viçosa, MG, 2015.

xvi, 80f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

..Inclui anexo.

Orientador: Clóvis Andrade Neves.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.64-79.

1. Infarto do miocárdio. 2. Terapia celular. 3. Exercícios físicos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

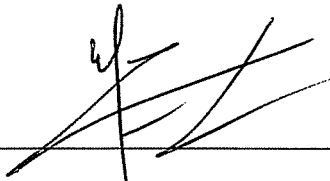
CDD 22. ed. 616.1237

JULIANA SILVEIRA DE FREITAS

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO ASSOCIADO À TERAPIA COM  
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS SOBRE O REMODELAMENTO E  
FUNÇÃO CARDÍACA DE RATOS INFARTADOS**

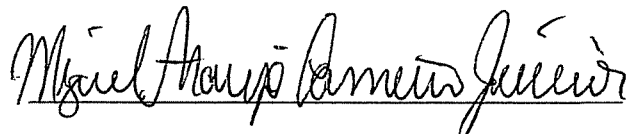
Tese apresentada à Universidade Federal  
de Viçosa, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Estrutural, para obtenção do  
título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de agosto de 2015.




---

Wellington Lunz



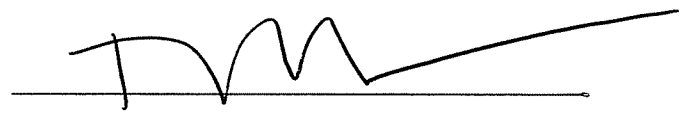
---

Miguel Araujo Carneiro Junior




---

Sirlene Souza Rodrigues Sartori



---

Thales Nicolau Primola Gomes



---

Clóvis Andrade Neves  
(Orientador)

**Aos meus pais, Francisco e Maria.  
À memória do meu avô Joaquim.  
Todo meu amor e minha gratidão.**

## AGRADECIMENTOS

Início agradecendo a Deus por ter caminhado sempre ao meu lado e me amparado nos momentos de dificuldade.

Ao professor e orientador Clóvis Andrade Neves, pela oportunidade de trabalho e pela confiança em mim depositada. Agradeço por todos os ensinamentos e conselhos ao longo desses quatro anos. Sua paixão pelo ensino e pela pesquisa me inspira a cada dia.

Ao professor e coorientador Antônio José Natali, minha primeira referência de pesquisador e professor, exemplo de ética e humildade que levarei comigo por toda a vida.

Ao professor e coorientador Ricardo Junqueira Del Carlo, pelos ensinamentos e pela parceria que proporcionou a utilização da metodologia das células-tronco nesse projeto.

À Dra. Daise Nunes Queiroz da Cunha, peça fundamental na elaboração e execução desse projeto. Agradeço por todos os ensinamentos durante a jornada de experimentos.

À professora Edilamar Menezes de Oliveira, pela oportunidade de realizar e aprender as análises moleculares em seu laboratório na USP. Agradeço toda atenção e gentileza a mim concedidas.

Aos professores membros da banca de qualificação: Antônio José Natali, Ricardo Junqueira Del Carlo, Sérgio Luís Pinto da Matta e Rômulo Dias Novaes, pela contribuição e pelos pertinentes apontamentos que engrandeceram esse trabalho.

Aos professores membros da banca de doutorado: Wellington Lunz, Miguel Araujo Carneiro Júnior, Sirlene Souza Rodrigues Sartori e Thales Nicolau Prímola Gomes, sinto-me muito honrada pela participação nesse exame de defesa.

Aos mestres Felipe Gomes Belfort e Victor Neiva Lavorato, companheiros nos incansáveis dias de treinamento físico, isolamento de células, cirurgias, análises, enfim, dias de muito trabalho e muito aprendizado. Obrigada pela companhia e amizade.

Às médicas veterinárias Vanessa Guedes Pereira e Bárbara Silva Okano, parceiras que abraçaram esse projeto e trabalharam de forma imprescindível para a realização do experimento.

À técnica de laboratório Glória de Fátima Alves da Mota, pelos ensinamentos e ajuda nas análises moleculares na USP.

À secretária da Pós-Graduação da Biologia, Beth, sempre apoiando e socorrendo os estudantes com muita gentileza e carinho.

Ao laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV, que me abrigou nas intermináveis horas de inclusões, microtomia, colorações, análises morfométricas. Foram muitas horas de estudo, trabalho, aprendizado. Foi local também de muitas risadas, descontração e novas amizades.

Ao laboratório de Biologia do Exercício Físico – BioEx do departamento de Educação Física da UFV, e a todos que auxiliaram no treinamento dos animais: Luís Henrique, Filipe, Matheus, Anselmo, Helder, Aurora, Camila.

Ao Hospital Veterinário do Departamento de Medicina Veterinária da UFV, por ceder o espaço no centro cirúrgico para realização das cirurgias e estudos hemodinâmicos.

Ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Exercício da Escola de Educação Física e Esportes (EEFE) da USP, pela oportunidade de realizar as análises moleculares.

Ao Laboratório de Citogenética de Insetos e Laboratório de Sistemática Molecular do Departamento de Biologia Geral da UFV, por ceder os microscópios para as análises histológicas.

Ao laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários do BioAgro da UFV, pela possibilidade de desenvolver a cultura de células-tronco mesenquimais.

À UFV e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pelo apoio na minha formação profissional.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, por todos os ensinamentos durante as disciplinas.

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

À amiga Bárbara Braga, amiga fiel que me encorajou a trilhar esse caminho.

Às amigas conquistadas graças ao doutorado. Em especial Mariana Moraes, Marli, Suellen, Ana Cláudia, Tatiana, Juliana Malta, Robertinha, Stéphanie, Graziela.

À minha família. Meus pais, pelo amor incondicional e suporte emocional em todos os momentos da minha vida. Aos meus irmãos e minha sobrinha, pelo amor, carinho e momentos felizes nos fins de semana em BH.

Ao meu esposo Luís Eduardo, pelo amor e carinho diários. Suas palavras doces me apoiaram e me incentivaram a chegar até aqui.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho e concretização deste sonho.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 Infarto do miocárdio e remodelamento cardíaco.....	1
1.2 Hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica – diferenças estruturais e moleculares.....	3
1.3 Mecanismos de sinalização intracelular para hipertrofia cardíaca.....	6
1.4 Sinalização intracelular pela via da calcineurina-NFAT no remodelamento cardíaco patológico.....	8
1.5 Sinalização intracelular pela via PI3K-AKT-mTOR no remodelamento cardíaco fisiológico.....	10
1.6 Tratamentos não farmacológicos após infarto do miocárdio.....	13
2. OBJETIVO.....	19
3. METODOLOGIA.....	20
3.1 Aspectos éticos.....	20
3.2 Animais e grupos experimentais.....	20
3.3 Anestesia.....	21
3.4 Indução do infarto do miocárdio.....	21
3.4.1 Toracotomia e infarto do miocárdio.....	21
3.4.2 Cuidados pós-operatórios.....	22
3.5 Obtenção e cultura das células-tronco mesenquimais (CTM).....	22
3.5.1 Caracterização celular.....	23
3.5.2 Nanomarcagem das CTM.....	24
3.5.3 Transplante das CTM e identificação das CTM nos tecidos.....	25
3.6 Protocolo de treinamento físico e teste de capacidade de corrida.....	26
3.7 Análise ecocardiográfica.....	27
3.8 Biometria cardíaca e conteúdo de água pulmonar.....	28
3.9 Análise histológica do tamanho do infarto, conteúdo de colágeno e percentual de vasos no tecido cardíaco.....	28

3.10 Comprimentos, largura e volume de cardiomiócitos.....	30
3.11 Expressão de proteínas cardíacas.....	31
3.12 Análise da expressão gênica cardíaca.....	33
3.13 Análise estatística.....	34
4. RESULTADOS.....	35
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÃO.....	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
8. ANEXOS.....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 4EBP1: proteína 1 de ligação ao 4E
- AKT: proteína quinase B
- AngII : angiotensina II
- ATP: adenosina trifosfato
- Ca<sup>2+</sup>: íon cálcio
- CEUA: comissão de ética para uso de animais
- CTM: células-tronco mesenquimais
- DAG: diacilglicerol
- DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
- DATASUS: departamento de informática do sistema único de saúde do Brasil
- DCV: doenças cardiovasculares
- DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
- DMEM: dulbecco's modified eagle's medium
- dP/dt<sub>Max</sub> : valor máximo da derivada temporal de pressão ventricular
- dP/dt<sub>Min</sub> : valor mínimo da derivada temporal de pressão ventricular
- DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
- ECG: eletrocardiograma
- EDTA: ácido etilenodiamino tetracético
- eIF4E: fator de iniciação da tradução eucariótica 4E
- eIF4G: fator de iniciação da tradução eucariótica 4G
- EPPVE<sub>d</sub>: espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo durante a diástole
- EPPVE<sub>s</sub>: espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo durante a sístole
- ESIV<sub>d</sub>: espessura do septo interventricular durante a diástole
- ESIV<sub>s</sub>: espessura do septo interventricular durante a sístole
- ET1: endotelina 1
- EX IM CT: exercitado infartado tratado com células-tronco mesenquimais
- EX IM: exercitado infartado
- EX SH: exercitado sham
- FCR: frequência cardíaca de repouso
- FLBser16: fosfolambam forforilada no resíduo da serina 16
- FNA: fator natriurético atrial
- GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GATA4: fator de transcrição 4 da família GATA  
GPCR: receptor acoplado à proteína G  
GSK3 $\beta$ : quinase glicogênio sintase 3 $\beta$   
IGF: fator de crescimento semelhante à insulina  
IGF-1R: receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1  
IM: infarto agudo do miocárdio  
IP3: inositol-1,4,5, trifosfato  
MAPKs: proteínas quinases ativadas por mitógenos  
MCP: miosina de cadeia pesada  
MEF2: fator potencializador de miócito 2  
mTOR: proteína quinase alvo da rapamicina de mamíferos  
NFAT: fator nuclear ativador de células T  
PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida  
PCEN: perímetro da cicatriz endocárdica  
PCEP: perímetro da cicatriz epicárdica  
PENVE: perímetro endocárdico do ventrículo esquerdo  
PEPVE: perímetro epicárdico do ventrículo esquerdo  
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas  
PDK1: proteína quinase-1 dependente de fosfoinosítídeo 3  
PI3K: fosfoinosítídeo 3 quinase  
PKC: proteína quinase C  
PLC: fosfolipase C  
S6K1: quinases ribossomal 1 da família S6  
SBCAL: sociedade brasileira de ciência em animais de laboratório  
SDS: dodecil sulfato de sódio  
SED IM: sedentário infartado  
SED IM CT: sedentário infartado tratado com células-tronco mesenquimais  
SED SH: sedentário sham  
SERCA 2: isoforma cardíaca da Ca<sup>2+</sup> ATPase do retículo sarcoplasmático  
TGF-  $\beta$  fator de crescimento tumoral beta  
TIMP: inibidor tecidual de metaloproteinase da matriz  
TSG 6: proteína de gene 6 induzida por fator de necrose tumoral  
VD: ventrículo direito  
VE: ventrículo esquerdo

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

VMC: velocidade máxima de corrida

VO<sub>2max</sub>: volume máximo de oxigênio

## LISTA DE FIGURAS

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

**Figura 2:** Imagens de microscopia de fluorescência. (A) Fotomicrografia de CTM nanomarcada com Q-tracker, comprovando os nanocristais citoplasmáticos fluorescentes emitidos pela célula em suspensão antes de ser injetada nos animais. Barra:  $10\mu\text{m}$ . (B) Identificação de células transplantadas presentes no pulmão 18 horas pós-infarto. Os asteriscos indicam os alvéolos pulmonares, as setas apontam as CTM e os núcleos (N) foram contra-corados com DAPI em azul. Barra:  $50\mu\text{m}$ .

**Figura 3:** Imagem representativa de um corte transversal do coração delimitando as regiões escolhidas do ventrículo esquerdo para análise de conteúdo de colágeno e de vasos sanguíneos.

**Figura 4:** Representação dos pontos de medição da imagem dos miócitos cardíacos. Barra com comprimento de  $10\mu\text{m}$ . As linhas indicam como foram obtidos o comprimento (verde) e a largura (amarelo).

**Figura 5:** Desempenho físico e frequência cardíaca de ratos ao final do período experimental. N = 12 por grupo. (A) Teste de capacidade de corrida (minutos) no final do período experimental. (B) Frequência cardíaca de repouso (batimentos por minuto) no final do período experimental.

**Figura 6:** Fotomicrografias representativas de cortes transversais da parte média do coração coradas com Picrosirius red.

**Figura 7:** Tamanho do infarto nos grupos experimentais.

**Figura 8:** Percentual de água no pulmão.

**Figura 9:** Fotomicrografia representativa da região infartada do ventrículo esquerdo evidenciando a cicatriz de colágeno tipo I.

**Figura 10:** Fotomicrografias representativas da região remota do ventrículo esquerdo coradas com picosirius red sob luz polarizada. O colágeno cora-se em tons de laranja e vermelho. O fundo escuro compreende regiões de músculo cardíaco e tecido intersticial não ocupadas pelo colágeno.

**Figura 11:** Fotomicrografia representativa da região isquêmica corada com PAS e contracorada com hematoxilina de Harris. O asterisco representa as fibras colágenas, setas pretas indicam capilares; setas vermelhas indicam vênulas e setas amarelas apontam arteríolas.

**Figura 12:** Expressão proteica de VEGF na região remota ao infarto no ventrículo esquerdo. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), unidades arbitrárias (u.a.). A banda alvo foi normalizada pela expressão de GADPH.

**Figura 13:** Expressão proteica no ventrículo esquerdo das proteínas da via de sinalização de hipertrofia fisiológica. AKT total (AKT), AKT fosforilada (pAKT), mTOR total (mTOR), mTOR fosforilada (pmTOR).

**Figura 14:** Expressão proteica no ventrículo esquerdo das proteínas da via de sinalização de hipertrofia patológica. As bandas alvo foram normalizadas pela expressão de GADPH. Calci (Calcineurina), u.a. (unidades arbitrárias).

**Figura 15:** Expressão gênica na região remota do ventrículo esquerdo nos diferentes grupos experimentais.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Parâmetros biométricos de ratos infartados tratados com exercício físico e transplante de células-tronco mesenquimais.

**Tabela 2:** Dados ecocardiográficos de ratos infartados tratados com exercício físico e transplante de células-tronco mesenquimais.

**Tabela 3:** Conteúdo de colágeno ( $\%/mm^2$ ) no ventrículo esquerdo em cada uma das três áreas analisadas (cicatriz, borda de transição e remota).

**Tabela 4:** Percentual de vasos por milímetro quadrado ( $\%/mm^2$ ) no ventrículo esquerdo em cada uma das três áreas analisadas (cicatriz, borda de transição e remota).

**Tabela 5:** Características morfológicas dos cardiomiócitos isolados do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais.

## RESUMO

FREITAS, Juliana Silveira de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2015. **Efeitos do treinamento físico associado à terapia com células-tronco mesenquimais sobre o remodelamento e função cardíaca de ratos infartados.** Orientador: Clóvis Andrade Neves.

O tratamento da insuficiência cardíaca em decorrência do infarto do miocárdio (IM) conta atualmente com diversos tipos de intervenções. O treinamento físico (TF) e a terapia com células-tronco mesenquimais (CTM) têm sido utilizados, contudo, os efeitos da associação dessas terapias são pouco estudados. Este estudo teve como objetivo verificar se o exercício físico de baixa intensidade associado à terapia com CTM poderia afetar de modo benéfico o remodelamento e a função cardíaca de ratos infartados. Ratos Wistar (idade: 30 dias, peso corporal:  $118 \pm 11$ g) foram divididos nos grupos: sedentário sham (SED SH); sedentário infartado (SED IM); sedentário infartado + CTM (SED IM CT); exercitado sham (EX SH); exercitado infartado (EX IM) e exercitado infartado + CTM (EX IM CT). Animais dos grupos IM foram submetidos à toracotomia e ligadura da artéria coronária anterior descendente esquerda. O programa de treinamento consistiu de 60 minutos, 5x/semana, 60% da velocidade máxima de corrida, iniciado 24 horas após o IM com duração de 12 semanas. Células-tronco mesenquimais da medula óssea do fêmur de ratos Wistar (concentração:  $1 \times 10^6$  células) foram injetadas de forma alogênica via veia caudal imediatamente após o IM. Foram avaliados: teste físico em esteira; análise ecocardiográfica; tamanho do IM; conteúdo de colágeno; percentual de vasos; hipertrofia cardíaca e celular; expressão proteica de AKT, mTOR, calcineurina, NFAT e VEGF; expressão gênica de  $\alpha$ -actina esquelética, FNA,  $\alpha$ -MCP e  $\beta$ -MCP. O IM promoveu alterações deletérias ao coração, aumentando os parâmetros: massa cardíaca, índice cardiossomático, diâmetro da parede do ventrículo esquerdo, diâmetro da câmara ventricular esquerda, comprimento e volume dos cardiomiócitos e fibrose intersticial, além de prejudicar parâmetros funcionais como fração de ejeção e fração de encurtamento. O protocolo de exercício aeróbio de baixa intensidade em esteira melhorou a capacidade física dos animais, induziu a bradicardia de repouso, aumentou a fração de ejeção e fração de encurtamento, reduziu o tamanho do infarto e a fibrose intersticial no ventrículo esquerdo, reduziu a expressão de genes marcadores de hipertrofia cardíaca patológica (actina  $\alpha$ -esquelética, FNA e  $\beta$ -MCP) e aumentou a relação de  $\alpha/\beta$ -MCP. A terapia celular com CTM, por sua vez, reduziu o

tamanho do infarto e a fibrose intersticial e melhorou os parâmetros de fração de ejeção e encurtamento nos animais sedentários. A associação dos tratamentos não causou alterações significativas nos parâmetros avaliados. Conclui-se que os tratamentos, avaliados de forma isolada, causaram adaptações benéficas que resultaram em melhora da função cardíaca geral. No entanto, ao serem associados, não mostraram sinergia que pudesse potencializar seus benefícios.

## ABSTRACT

FREITAS, Juliana Silveira de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2015.  
**Effects of exercise training associated with mesenchymal stem cells therapy on the cardiac function and remodeling of infarcted rats.** Adviser: Clóvis Andrade Neves.

The treatment of heart failure as a consequence of myocardial infarction (MI) has currently various types of interventions. The exercise training (ET) and therapy with mesenchymal stem cells (MSC) has been used, however, the effects of the combination of these therapies are poorly studied. This study aimed to verify if the exercise of low intensity associated with MSC therapy could affect beneficially the cardiac function and remodeling in infarcted rats. Male Wistar rats (age: 30 days; body weight:  $118 \pm 11$ g) were divided into six groups: sedentary sham (SED SHAM), sedentary infarction (SED MI), sedentary infarction plus stem cells (SED MI SC), trained sham (TR SHAM), trained infarction (TR MI) and trained infarction plus stem cells (TR MI SC). Animals from MI groups were subjected to thorotomy ligation of the anterior descending coronary artery. Animals from TR groups were submitted to a progressive treadmill running training for 12 weeks, being the final duration and intensity of 60 min and 60% of maximal running speed. MSCs from the Wistar rat femoral bone marrow were used to allogenic cell transplantation through the tail vein immediately after MI (concentration:  $1 \times 10^6$  cells). There were assessed: physical capacity; hemodynamic analysis; MI size; collagen content; vessels percentage; cellular and cardiac hypertrophy; protein expression of AKT, mTOR, calcineurin, NFAT and VEGF; gene expression of actin- $\alpha$ -skeletal, ANF,  $\alpha$ - $\beta$  and MHC-MHC. The IM promoted deleterious changes to the heart, increasing the parameters following: cardiac mass, cardiac somatic index, diameter of the left ventricular wall, diameter of the left ventricular chamber, length and volume of cardiomyocytes; interstitial fibrosis, and impair functional parameters as the fractions of ejection and shortening. The aerobic exercise protocol of low intensity treadmill improved the physical capacity of the animals, induced rest bradycardia, increased shortening and ejection fraction, reduced infarct size and interstitial fibrosis in the left ventricle, reduced the expression of pathological cardiac hypertrophy markers genes ( $\alpha$ -skeletal actin, atrial natriuretic factor (ANF) and  $\beta$ -myosin heavy chain ( $\beta$ -MHC) and increased the ratio of  $\alpha$  /  $\beta$ -MHC. Cell therapy with MSC, in turn, reduced infarct size and interstitial fibrosis and improved shortening and

ejection fraction parameters in the sedentary animals. The combination of the treatments did not cause significant changes in the evaluated parameters. In conclusion, the treatments evaluated in isolation, caused beneficial adaptations which resulted in improved overall cardiac function. However, when combined, they showed no synergy that could enhance their benefits.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1- Infarto do miocárdio e remodelamento cardíaco**

As doenças cardiovasculares ocupam o primeiro lugar no ranking de óbitos no mundo. Dados da Organização Mundial de Saúde indicam que elas são responsáveis por cerca de 30% das mortes que ocorrem anualmente em todo o mundo, cifra que se aproxima de 17 milhões de pessoas (Butler, 2011). O infarto agudo do miocárdio (IM) é a principal causa de mortalidade e morbidade associadas às doenças cardiovasculares (O’Gara et al., 2013). De acordo com a American Heart Association, cerca de 195 mil novos IM ocorrem a cada ano nos EUA (Roger et al., 2012) e no Brasil, aproximadamente 300 mil pessoas sofrem IM por ano e, dessas, 84 mil morrem (DATASUS).

O infarto do miocárdio é causado pela obstrução total ou parcial do fluxo sanguíneo nas artérias coronárias responsáveis pela irrigação do miocárdio. A interrupção súbita do fluxo sanguíneo coronário determina um quadro clínico de isquemia levando à morte parte da parede do coração, com danos irreversíveis ao órgão (French & Kramer, 2008; Mill et al., 2011; Thygesen et al., 2012; Nicolau et al., 2014).

Após um IM o coração passa por transformações estruturais, tanto no tecido necrosado quanto no miocárdio remanescente. Essas transformações são controladas por eventos celulares e moleculares, que em conjunto, determinam um processo conhecido como remodelamento cardíaco e tem por objetivo substituir os cardiomiócitos mortos por uma cicatriz de colágeno, vista a baixa taxa de regeneração cardíaca (Pfeffer et al., 1990; Dobaczewski et al., 2009; Gajarsa & Kloner, 2011; Mill et al., 2011).

O remodelamento cardíaco no IM é inicialmente um processo adaptativo para manter a função cardíaca, mas com o passar do tempo, assume caráter patológico, predispondo o indivíduo à insuficiência cardíaca, arritmia e morte (Pfeffer et al., 1990; Dobaczewski et al., 2009; Gajarsa & Kloner, 2011; Mill et al., 2011).

Qualquer perturbação na hemodinâmica circulatória ativa o sistema nervoso central, aumentando a atividade adrenérgica e ativando o sistema renina-angiotensina, de forma a manter a perfusão (Swynghedauw et al., 1999; Dobaczewsky et al., 2010). No entanto, os efeitos constantes dessa resposta causam a elevação da pré e da pós-carga, devido à vasoconstrição venosa e arterial, resultando em sobrecarga volumétrica (Gajarsa & Kloner, 2011; Mill et al., 2011; Zornoff et al., 2009).

Simultaneamente à morte das células do miocárdio, alterações da homeostase da matriz extracelular desempenham papel crítico no remodelamento cardíaco. A degradação da rede estrutural proteica por meio do aumento da atividade das metaloproteinases de matriz permite a distensão da região, tornando-a mais suscetível às deformações e resultando em alterações na geometria ventricular (Cleutjens et al., 2002; Holmes et al., 2005; Zornoff et al., 2009; Dobaczewski et al., 2009).

Nas primeiras 72 horas após um IM, a área do infarto se expande, evento caracterizado pelo afinamento da parede da área infartada, o qual facilita a dilatação da cavidade ventricular. Em consequência da expansão, o ventrículo perde a sua forma elíptica normal e assume uma configuração esférica, acarretando numa elevação do estresse parietal durante a diástole (Sutton & Sharpe, 2000; Cleutjens et al., 2002; Zornoff et al., 2009). O afinamento da parede ocorre primariamente pelo deslizamento dos miócitos em decorrência da degradação do colágeno, que não mais sustenta o tecido e permite o movimento celular (Pfeffer & Braunwald, 1990; Whittaker et al., 1994). Essa expansão é mais frequentemente observada em infartos grandes e transmuraais (Pfeffer & Braunwald, 1990; Zornoff et al., 2009).

Após 72 horas, síntese e deposição de nova matriz já são evidentes na área infartada. A produção, principalmente de colágeno, tem efeito sobre a estrutura e função cardíaca, pois enquanto previne a dilatação da área infartada, leva a uma rigidez tecidual, resultando em redução da complacência e prejuízos na capacidade contrátil (Cleutjens et al., 2002; De Waard et al., 2007; Xu et al., 2008). É interessante notar que a formação de tecido fibrótico se dá principalmente pela ação de miofibroblastos, células que se diferenciam a partir de fibroblastos e têm capacidade de proliferar, secretar proteínas de matriz e de propiciarem uma maior retração da área fibrótica (Dobaczewski et al., 2009).

Todas essas alterações estruturais causadas pelo remodelamento acarretam em prejuízo da funcionalidade cardíaca, destacando-se a redução da fração de ejeção, da fração de encurtamento, da pressão arterial média, da  $dP/dt_{Max}$  (valor máximo da derivada temporal de pressão ventricular) e  $dP/dt_{Min}$  (valor mínimo da derivada temporal de pressão ventricular), além do aumento da pressão diastólica e redução da pressão sistólica (Swynghedauw, 1999; Loennechen et al., 2002; Wisloff et al., 2002).

## **1.2- Hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica – diferenças estruturais e moleculares**

O coração é composto de miócitos (células musculares cardíacas) e não miócitos (fibroblastos, células endoteliais, células musculares lisas vasculares e mastócitos), além de uma abundante matriz extracelular. Os miócitos ventriculares perfazem o total de 1/3 do número de células, mas ocupam aproximadamente 70-80% da massa cardíaca (Zak, 1984). No coração de mamíferos, no nascimento ou logo após, as células reduzem a habilidade de se proliferarem e o crescimento do órgão se dá primariamente pelo aumento do tamanho do miócito (Soonpa, 1996).

Estudos recentes têm mostrado que a cardiomiogênese ocorre no coração de adultos, apesar da frequência de geração e da fonte de novas células cardíacas ainda gerarem muitos debates (Senyo et al., 2012; Anversa & Leri, 2013; Ellison et al., 2013; Nadal-Ginard et al., 2014; Van Berlo et al., 2014). Estima-se que a taxa de renovação dessas células varia de menos de 1% por ano (Bergmann et al., 2009; Hosoda et al., 2009; Soonpaa & Field, 1997) a mais de 40% por ano (Urbanek et al., 2005; Kajstura et al., 2010). Por muito tempo, o coração adulto foi considerado um órgão pós-mitótico no qual o número de células parenquimais era estabelecido no nascimento. Essa visão tem sido substituída por uma capacidade intrínseca e extrínseca de regeneração de cardiomiócitos, impondo uma reavaliação dos conceitos de homeostase cardíaca (Senyo et al., 2012; Ellison et al., 2013)

A hipertrofia cardíaca (aumento da massa cardíaca) constitui-se numa das principais respostas compensatórias às alterações hemodinâmicas impostas ao coração, sejam elas sobrecargas de volume ou de pressão. Sob essas determinadas circunstâncias, o músculo cardíaco deve trabalhar de forma mais intensa do que em condições normais, provocando um aumento no volume das células musculares para contrabalancear o aumento do estresse na parede ventricular (Colan, 1997; McMullen & Jennings, 2007; Bernardo et al., 2010). Esse aumento ocorre em resposta a condições patológicas, tais como hipertensão arterial ou IM, ou como resposta fisiológica, incluindo o crescimento normal após o nascimento, a gravidez e o crescimento desencadeado pela sobrecarga de trabalho imposta pelo treinamento físico contra resistência e aeróbio, realizado de maneira crônica por atletas (Colan, 1997; Iemitsu et al., 2001; Weeks & McMullen, 2011).

Tanto a hipertrofia cardíaca patológica quanto a fisiológica são associadas ao aumento do tamanho do coração. No entanto, a patológica está tipicamente associada com perda de miócitos (por necrose ou apoptose), aumento dos elementos intersticiais que levarão à formação de fibrose, disfunção cardíaca e aumento do risco de morte. (McMullen & Jennings, 2007). De forma contrária, a hipertrofia cardíaca fisiológica está associada com estrutura cardíaca normal, função cardíaca normal ou melhorada e se apresenta de forma reversível (Colan, 1997; Fagard, 1984; McMullen & Jennings, 2007; Bernardo et al., 2010; Elisson et al., 2012).

Em ambos os casos a hipertrofia pode ser classificada em dois tipos: concêntrica ou excêntrica, classificação baseada em mudanças no formato geométrico da câmara, que são dependentes do estímulo inicial dado ao cardiomiócito. A hipertrofia concêntrica refere-se ao aumento da espessura da parede e da massa cardíaca, com pequena redução ou nenhuma mudança no volume da câmara. É caracterizada por adições de sarcômeros em paralelo, aumentando a largura do miócito. Já a hipertrofia excêntrica refere-se ao aumento da parede ventricular cardíaca e do volume da câmara. É caracterizada por adição de sarcômeros em série, aumentando o comprimento do miócito (Grossman et al., 1975).

Em condições patológicas o estímulo que causa sobrecarga de pressão (ex: hipertensão, estenose aórtica) produz aumento do estresse na parede durante a sístole, causando a hipertrofia concêntrica. Por outro lado, a sobrecarga de volume (insuficiência mitral, IM) produz um aumento do estresse na parede durante a diástole e resulta na hipertrofia excêntrica (Grossman et al., 1975).

De forma similar, o estímulo fisiológico pode induzir o surgimento de ambas as formas de hipertrofia. O exercício aeróbio provoca sobrecarga volumétrica pelo aumento do retorno venoso, ou seja, aumento da pré-carga durante as sessões de exercício. Isso gera uma elevação no pico de tensão diastólica e induz o crescimento dos cardiomiócitos, com adição em série de novos sarcômeros e aumento do comprimento das miofibrilas, resultando em aumento da cavidade do ventrículo. A cavidade aumentada permite um estresse maior sobre a parede do ventrículo e uma elevação do pico de tensão sistólica, o que estimula o crescimento dos cardiomiócitos pela adição de sarcômeros também em paralelo, resultando num aumento da espessura da parede. Em consequência, gera hipertrofia do tipo excêntrica, cuja relação entre espessura da parede ventricular e raio da cavidade permanece inalterada (Fagard, 1984).

Já o treinamento contra-resistência ou de força impõe ao ventrículo uma sobrecarga de pressão, ou seja, aumento da pós-carga com elevado pico de tensão sistólica. Em resposta a esse estresse, o cardiomiócito cresce em diâmetro, com adição de sarcômeros em paralelo, resultando em aumento da espessura do ventrículo, sem alteração do tamanho da cavidade. Essa hipertrofia do tipo concêntrica se caracteriza pelo aumento da relação entre espessura da parede e raio da cavidade (Grossman et al., 1975; Colan et al., 1997). De forma ampla, ambas as hipertrofias patológicas apresentam-se de forma assimétrica e se correlacionam com o aumento do índice de morbi-mortalidade (Oliveira & Krieger, 2002).

Outras características estruturais e funcionais diferenciam as hipertrofias patológica e fisiológica. Em paralelo ao aumento do tamanho dos cardiomiócitos, a rede de fibras colágenas da matriz extracelular que fornece suporte estrutural ao parênquima, em um insulto patológico como o IM, se acumula excessiva e desproporcionalmente. Esse acúmulo leva ao enrijecimento ventricular, prejudicando o processo de contratilidade e relaxamento do músculo cardíaco (Mill & Vassallo, 2001; Gunasinghe & Spinale, 2004; Brower, 2006). Além da fibrose, a redução da densidade capilar aumenta as distâncias de difusão de oxigênio, agravando o quadro isquêmico e acelerando o processo de insuficiência cardíaca (Gunasinghe & Spinale, 2004).

De forma oposta, na hipertrofia fisiológica não ocorrem alterações desproporcionais do estroma nem prejuízo funcional do órgão. Além do aumento do número de sarcômeros nos cardiomiócitos, ocorre aumento do retículo sarcoplasmático e do tamanho e número de mitocôndrias para manter um estado funcional e proporcional à biogênese do aparato contrátil (Mill & Vassallo, 2001; Mann & Rosenzweig, 2012). Aumento do fluxo sanguíneo coronariano pela angiogênese, vasodilatação e melhora da extração de oxigênio também auxiliam na melhora da capacidade funcional miocárdica (Wu et al., 2009; Mann & Rosenzweig, 2012).

A hipertrofia cardíaca patológica em decorrência do IM está associada com re-expressão de genes fetais no VE, sendo observada a reexpressão do fator natriurético atrial (FNA), da actina  $\alpha$ -esquelética e da miosina de cadeia pesada beta ( $\beta$ -MCP). A MCP é o principal componente da miosina, um complexo proteico fundamental na contração das células musculares. A isoforma  $\beta$ -MCP é expressa no coração no período pré-natal e reduz sua expressão logo após o nascimento, quando aumenta a expressão de  $\alpha$ -MCP. No entanto, em situações patológicas, como no caso do IM, obtêm-se uma inversão no programa de gene fetal e, como a  $\beta$ -MCP é mais lenta em hidrolisar o ATP,

a sua expressão aumentada correlaciona-se a uma menor velocidade de encurtamento/relaxamento, prejudicando ainda mais a função contrátil (Chien & Knowlton, 1991; McMullen e Jennings, 2007; Rajabi et al., 2007; Bernardo et al., 2010). Esse padrão pode ser acompanhado por uma redução da expressão de genes normalmente expressos em altos níveis no ventrículo cardíaco de adultos, tais como a isoforma  $\alpha$ -MCP e a SERCA2 (McMullen & Jennings, 2007; Bernardo et al., 2010).

As alterações gênicas mencionadas acima não são encontradas em situações de hipertrofia fisiológica. O aumento do tamanho dos cardiomiócitos ocorre pela síntese de novos componentes contráteis, com alterações nas proporções das isoformas de actina e miosina sintetizadas, buscando adequar a força e a velocidade de contração em resposta ao estímulo de sobrecarga imposto ao coração (Pereira, 1993). Considerável atenção deve ser dada na alteração da composição das proteínas contráteis em decorrência do treinamento físico. O treinamento em natação acarretou aumento da expressão de  $\alpha$ -MCP com conseqüente aumento da atividade ATPase miosínica e melhora da função sistólica em ratos. Esse padrão de expressão pode ser mudado rapidamente caso esses mesmos animais sejam submetidos a uma sobrecarga patológica, alterando o padrão de expressão da isoforma  $\alpha$ -MCP para a isoforma  $\beta$ -MCP em dois a três dias (Schaible & Malhorta, 1986).

### **1.3- Mecanismos de sinalização intracelular para hipertrofia cardíaca**

A hipertrofia cardíaca que ocorre a partir da síntese proteica aumentada é dependente de estímulos extracelulares, que desencadearão uma sequência de eventos bioquímicos de sinalização celular, alterando no núcleo a transcrição gênica e no citoplasma a tradução ribossomal. Os sinais extracelulares que chegam à membrana celular são percebidos pelos miócitos através de receptores, canais iônicos ou outras proteínas ancoradas à membrana. Esses, ao serem acionados, é que gerarão a cascata de sinais que coordenará o crescimento celular (Heineke & Molketin, 2006; McMullen & Jennings, 2007; Bernardo et al., 2010).

O estímulo mais importante para a hipertrofia cardíaca no miocárdio é o estresse mecânico que ocorre através de um aumento da tensão sistólica e diastólica, acarretando em estiramento dos cardiomiócitos e liberação de fatores neuro-humorais. O estiramento é percebido pela célula através de uma família de receptores de superfície celular, as integrinas (Hynes, 1992). Essas proteínas são compostas por uma unidade  $\alpha$  e

uma unidade  $\beta$ ; apresentam um grande domínio extracelular, uma região transmembrana e pequeno domínio citoplasmático (Giancotti & Ruoslahti, 1999; Hynes, 1992). As integrinas, juntamente com outras proteínas associadas ao citoesqueleto (talina, vinculina,  $\alpha$  actina), conectam o aparato contrátil sarcomérico com a matriz extracelular através da membrana plasmática, transformando o estímulo mecânico em sinais bioquímicos que acionam a cascata molecular e ativam o programa de hipertrofia cardíaca (Brancaccio et al., 2006; Hynes, 1992; Ross & Borg, 2001).

Estudos *in vitro* demonstraram que a superexpressão de integrinas induziram a resposta hipertrófica de miócitos ventriculares de ratos recém-nascidos (Pham, 2000) enquanto a inibição da subunidade  $\beta 1$  da integrina reduziu a sinalização para hipertrofia estimulada por agentes adrenérgicos (Ross et al., 1998). Em modelos *in vivo*, ratos e camundongos submetidos à constrição da aorta para provocar hipertrofia patológica, aumentaram a expressão das subunidades  $\beta 1A$ ,  $\beta 1D$ ,  $\alpha 3$  e  $\alpha 7$ , bem como a reexpressão de  $\alpha 1$  e  $\alpha 5$ , subunidades que são expressas durante o desenvolvimento, mas reguladas negativamente no miocárdio adulto normal (Babbitt et al., 1999). Da mesma forma que a sobrecarga de pressão, a sobrecarga volumétrica provocada pelo IM aumentou a expressão da subunidade  $\alpha 1$  da integrina nos miócitos da região da borda do infarto e no tecido remodelado da região infartada. A subunidade  $\alpha 5$  teve sua expressão aumentada na borda do infarto e no tecido miocárdico não infartado (Nawata et al., 1999). Todos esses dados, tomados em conjunto, demonstram que as integrinas são partes importantes no processo de resposta hipertrófica cardíaca.

Além do estímulo mecânico, uma variedade de fatores estimula a expressão das integrinas. Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), angiotensina II (AngII), fator de crescimento tumoral beta (TGF-  $\beta$ ), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), dentre outros, parecem modular a expressão das integrinas de forma parácrina ou autócrina, no entanto, a via precisa de sinalização através da qual esses fatores de crescimento interagem com os receptores integrinas nos cardiomiócitos não é totalmente esclarecida (Ross & Borg, 2001).

Embora as vias de transdução de sinais sejam inerentemente complexas e abundantes, as vias de sinalização responsáveis por mediar a hipertrofia cardíaca fisiológica ou patológica melhor caracterizadas são: a via de síntese AKT-mTOR e a via da calcineurina-NFAT. Outras vias de sinalização associadas à hipertrofia incluem a via da JAK/STAT, MAPKs e PKC (Wilkins & Molketin, 2004; Heineke & Molketin, 2006; McMullen & Jennings, 2007; Bernardo et al., 2010).

#### **1.4- Sinalização intracelular pela via da calcineurina-NFAT no remodelamento cardíaco patológico**

As proteínas G fazem parte de um grupo de proteínas de membrana envolvidas na transdução de sinais e resposta celular. São divididas em dois principais subgrupos: proteínas G heterotriméricas e proteínas G monoméricas ou pequenas proteínas G. As proteínas G heterotriméricas possuem três subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) nas quais se acoplam os receptores específicos, receptores acoplados à proteína G (GPCR). A ligação de um agonista ao seu receptor leva à dissociação das subunidades  $G\alpha$  e  $G\beta\gamma$  e ativação das moléculas de sinalização na cascata (Rockman et al., 2002).

Em resposta à sobrecarga hemodinâmica que ocorre no coração, a liberação de fatores cardíacos autócrinos ou parácrinos, incluindo angiotensina II, endotelina 1 (ET1) e noradrenalina, desempenham importante papel no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica (Heineke & Molketin, 2006; McMullens & Jennings, 2007; Bernardo et al., 2010; Weeks & McMullens, 2011). Ao serem liberados, esses fatores ligam-se aos seus receptores GPCR, tais como: receptor de angiotensina II do tipo 1, receptores de endotelina tipo A e tipo B e receptores adrenérgicos (tipos  $\alpha$  e  $\beta$ ). Essa ligação causa a liberação e ativação da subunidade  $G_{\alpha q/11}$  que iniciará a sinalização intracelular para indução da hipertrofia cardíaca patológica (McMullen & Jennings, 2007; Bernardo et al., 2010).

A subunidade  $\alpha$  da proteína G heterotrimérica possui quatro subfamílias e a isoforma  $G_{\alpha q}$  desempenha importante papel na via de indução de hipertrofia cardíaca patológica. Em estudos com camundongos nocautes para isoforma  $G_{\alpha q/11}$ , a hipertrofia cardíaca não se desenvolveu em resposta a um modelo de sobrecarga de pressão (Akhter, 1998) e a superexpressão provocou hipertrofia associada com disfunção cardíaca e morte prematura (D'Angelo et al., 1997; Mende et al., 1998).

Estando já dissociadas do receptor, as subunidades  $G\alpha$  e  $G\beta\gamma$  da proteína G amplificam e propagam o sinal extracelular, modulando a atividade de uma ou mais moléculas efetoras, tais como fosfolipases, adenilil ciclase e canais iônicos. Quando a proteína G se associa à fosfolipase C (PLC), ocorre formação de diacilglicerol (DAG) que funciona como um ligante intracelular de proteína quinase C (PKC) e de inositol-

1,4,5, trifosfato (IP<sub>3</sub>). A partir do acúmulo de IP<sub>3</sub>, ele se liga ao seu receptor I(1,4,5)P<sub>3</sub>R localizado no retículo sarcoplasmático resultando numa mobilização de Ca<sup>2+</sup> para o meio citoplasmático (Rockman et al., 2002).

Sabe-se que o miocárdio hipertrofiado em decorrência de uma patologia, como hipertensão ou IM, apresenta alterações prejudiciais nas propriedades mecânicas dos cardiomiócitos, decorrentes de modificações nas proteínas reguladoras do transiente de Ca<sup>2+</sup>. Essas alterações proteicas fazem com que ocorra uma redução do pico de transiente de Ca<sup>2+</sup> e aumento do tempo para relaxamento e decaimento de Ca<sup>2+</sup>, resultando na elevação dos níveis intracelulares de Ca<sup>2+</sup> durante a diástole (Wisloff et al., 2002; De Waard et al., 2007). Esse aumento está relacionado à maior ativação da via de sinalização sensitiva ao Ca<sup>2+</sup>, cujas proteínas mais importantes dependentes de Ca<sup>2+</sup> para ativação incluem a proteína cálcio/calmodulina e calcineurina (Molketin, 2004; Wilkins & Molketin, 2004).

A calcineurina é uma fosfatase serina/treonina dependente de cálcio/calmodulina que possui uma subunidade catalítica (CnA) e uma subunidade regulatória (CnB). Essa proteína dimérica se torna ativa por meio da ligação direta à calmodulina, proteína adaptadora de ligação ao Ca<sup>2+</sup>, quando essa se encontra saturada com o íon. (Molketin, 2004; Wilkins & Molketin, 2004; Heineke & Molketin, 2006).

Uma vez ativada, a calcineurina desfosforila o fator de transcrição fator nuclear ativador de células T (NFAT) presente no citoplasma. A desfosforilação do NFAT promove sua translocação para o núcleo onde, associando-se a outros fatores de transcrição, tais como GATA4 e MEF2, ativa e regula a transcrição de genes cardíacos (Wilkins et al, 2004).

Vários estudos demonstraram o papel da calcineurina na hipertrofia cardíaca patológica. Camundongos transgênicos que superexpressam uma forma ativada da calcineurina no coração desenvolveram hipertrofia cardíaca, progredindo rapidamente para cardiomiopatia dilatada, com extensiva fibrose, insuficiência cardíaca congestiva e morte súbita aos 3 meses de idade (Molketin et al., 1998). Em outro estudo, a atividade da calcineurina estava super-regulada nos corações hipertrofiados de ratos submetidos à bandagem da aorta (Shimoyama et al., 1999). Em humanos, a calcineurina também apresentou atividade aumentada nos corações de pacientes com insuficiência cardíaca (Haq et al., 2001). Em contraste, camundongos deficientes em calcineurina exibiram uma resposta hipertrófica amenizada em resposta à modelos de hipertrofia patológica

(sobrecarga de pressão, infusão de AngII ou infusão de isoproterenol) (Bueno et al., 2002).

O estudo de Wilkins et al, (2004) confirma o papel da calcineurina-NFAT na hipertrofia patológica. O estudo objetivou comparar a participação da via da calcineurina mediante estímulo fisiológico (treinamento físico, infusão de IGF) e estímulo patológico (infarto do miocárdio, sobrecarga de pressão). Os resultados mostraram que os modelos de exercício falharam em aumentar a atividade das proteínas calcineurina-NFAT, e os modelos de hipertrofia patológica aumentaram sua atividade e expressão. De forma similar, Oliveira et al., (2009) investigaram o efeito do treinamento em esteira nas vias de sinalização da calcineurina e AKT/mTOR em modelos genéticos de insuficiência cardíaca induzida por hiperatividade simpática e demonstraram que os animais com insuficiência cardíaca destreinados apresentaram expressão de calcineurina aumentada enquanto que o treinamento diminuiu esse parâmetro para os níveis dos animais saudáveis. A expressão de NFAT e GATA4 também apresentou o mesmo padrão de expressão da calcineurina, dando suporte à ideia de que o treinamento físico possui um efeito anti-remodelamento cardíaco, desativando a via de hipertrofia patológica.

Reconhecida a importância da via de sinalização calcineurina/NFAT no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica, faz-se necessário identificar estratégias terapêuticas que possam agir nessa via com o intuito de melhorar a função muscular cardíaca e retardar a progressão da insuficiência.

### **1.5- Sinalização intracelular pela via PI3K-AKT-mTOR no remodelamento cardíaco fisiológico**

Estudos com humanos e animais demonstram que certos fatores são preferencialmente liberados em resposta a estímulos fisiológicos e patológicos. O fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) tem reconhecida importância na regulação do tamanho de órgãos e do corpo e está bem estabelecido na literatura que sua liberação ocorre em resposta ao treinamento físico. A expressão cardíaca de IGF-1 (mas não de ET-1 ou AngII) é mais alta em atletas profissionais em relação a indivíduos sedentários (Koziris et al., 1999; Neri et al., 2001) e os níveis plasmáticos de IGF-1 são elevados em animais submetidos ao treinamento físico crônico (Yeh et al., 1994).

A ligação de IGF-1 ao receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1R) aciona uma lipídeo quinase, a fosfoinosítídeo 3 quinase (PI3K). A PI3K é um heterodímero que consiste de uma subunidade p85 regulatória e uma subunidade catalítica p110 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (Oudit, 2004). Quando a PI3K é ativada por receptores tirosina/quinase ou receptor de citocinas é chamada de classe A e quando ativada a partir de receptores acoplados à proteína G é classificada como classe B (Oudit & Penninger, 2009).

Camundongos transgênicos que superexpressam o IGF-1R apresentaram corações aumentados (com aproximadamente 40% de aumento no peso, com aumento proporcional da espessura da parede ventricular e de todas as câmaras), aumento no tamanho do miócito e nenhuma evidência de necrose e fibrose, além de função sistólica melhorada (McMullen et al., 2004). Em contrapartida, a deleção de IGF-1R em miócitos cardíacos de camundongos, atenuou a resposta hipertrófica em decorrência do treinamento de natação (Kim et al., 2008).

A expressão constitutiva de uma forma ativa de p110 $\alpha$  resultou em hipertrofia cardíaca com função preservada, característica típica da hipertrofia fisiológica. De modo contrário, a expressão de uma forma inativa da subunidade p110 $\alpha$  impediu a resposta hipertrófica durante o crescimento após o nascimento e após o estímulo com exercício (Shioi et al., 2000; McMullen et al., 2003). Modelos com manipulação genética para deleção da subunidade regulatória p85 mostraram tamanho reduzido do coração, mesmo após treinamento físico por 4 semanas (Luo et al., 2005).

Em outro estudo, camundongos transgênicos para atividade elevada ou reduzida da PI3K(p110 $\alpha$ ) no coração foram submetidos a um programa de treinamento físico seguido de uma semana de sobrecarga de pressão (bandagem da aorta). Os animais controles (não treinados e não transgênicos) apresentaram hipertrofia cardíaca patológica, com função sistólica prejudicada e congestão pulmonar, fenótipo atenuado pelos animais submetidos ao treinamento. Além disso, camundongos com a atividade da PI3K aumentada foram protegidos do remodelamento, independente do status do exercício, enquanto o treinamento não ofereceu nenhuma proteção aos animais com reduzida atividade da PI3K. Os resultados sugerem que é necessária a ativação da via PI3K através do exercício para que ocorra a hipertrofia cardíaca fisiológica (Weeks et al., 2012). De forma similar, o mesmo modelo genético submetido ao IM demonstrou que animais com expressão aumentada da PI3K apresentaram melhores funções

cardíacas e que essa ativação aumentada protege o coração da insuficiência cardíaca após IM (Lin et al., 2010).

Uma vez a PI3K ativada, ela fosforila o fosfatidilinositol 4,5 da membrana plasmática na posição 3' do anel do inositol, levando ao recrutamento da proteína quinase AKT (também conhecida com PKB – proteína quinase B) e seu ativador proteína quinase-1 dependente de fosfoinosítídeo 3 (PDK1) do sarcolema. Ao ser recrutada, a proteína PDK fosforila a AKT, ativando-a (Cantley, 2002).

A AKT é uma serina/treonina/quinase essencial para o crescimento cardíaco após o nascimento, o qual é predominantemente obtido através da hipertrofia dos cardiomiócitos individuais (Shiojima, 2006). Essa quinase ocorre em três isoformas, porém apenas as isoformas AKT1 e AKT2 são expressas no coração (Lawlor & Alessi, 2001; Mende et al., 2001).

Uma forte evidência do envolvimento da AKT1 na hipertrofia cardíaca induzida pelo exercício vem de um estudo que examinou camundongos nocautes para essa proteína. Os animais nocauteados não apresentaram o fenótipo de hipertrofia cardíaca em resposta ao estímulo de treinamento em natação, sendo resistentes à síntese proteica estimulada pelo IGF-1 (DeBosch et al., 2006). Outro estudo avaliou a expressão da AKT em camundongos submetidos ao treinamento de esteira e mostrou que a expressão total da proteína não é alterada, no entanto encontra-se cronicamente hiperfosforilada na serina 473 (Kemi et al., 2008).

A AKT fosforilada age em duas moléculas distintas: a quinase glicogênio sintase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) e proteína quinase alvo da rapamicina de mamíferos (mTOR). A AKT inibe a ação de GSK3 $\beta$ , uma quinase regulatória importante que controla negativamente o crescimento cardíaco. A GSK3 $\beta$  está envolvida na inibição do crescimento cardíaco após o nascimento e redução da hipertrofia provocada por sobrecarga de pressão (Zhai et al., 2007), portanto, sua inibição pela AKT é um importante mecanismo para hipertrofia cardíaca (Haq et al., 2000).

A quinase mTOR, ao ser ativada pela AKT, aumenta a síntese proteica celular. Assim que é ativada, essa proteína vai agir sobre quinases ribossomais da família S6 (S6K1 e S6K2), consideradas críticas na biossíntese ribossomal, tradução de proteínas, progressão do ciclo celular e hipertrofia (McMullens & Jennings, 2007; Cantley, 2002). A atividade da S6K1 é elevada em camundongos transgênicos para superexpressar as proteínas IGF-1 e PI3K, confirmando que ela é um substrato alvo importante na via de sinalização para hipertrofia cardíaca fisiológica (Shioi et al., 2000; McMullen et al.,

2004). No entanto, a deleção gênica de S6K1 e S6K2 não alterou o crescimento celular induzido por treinamento físico, sugerindo que deve haver outros substratos alvos além das S6Ks que a mTOR possa atuar (McMullen et al., 2004).

Além das S6K, a mTOR age liberando a proteína 1 de ligação ao 4E (4EBP1) do fator de iniciação da tradução eucariótica 4E (eIF4E). Uma vez liberado, o eIF4E liga-se a um outro fator de iniciação, eIF4G (fator de iniciação da tradução eucariótica 4G) que por sua vez inicia a tradução ribossomal (Cantley, 2002; Proud, 2004). O estudo de Kemi e colaboradores (2008) mostrou que parte dessa via foi alterada pelo treinamento físico. O programa de corrida de 8 semanas causou hipertrofia fisiológica com melhora da função cardíaca, acompanhada de ativação da mTOR, mensurada pela maior fosforilação de seus substratos S6K1 e 4EBP1. Além disso, a síntese proteica e a expressão da cascata de sinalização AKT/mTOR/S6K1/4e-BP1 foi regulada negativamente no modelo de hipertrofia patológica induzida por sobrecarga de pressão (compressão transversal da aorta).

Vários estudos que investigaram a ativação e inibição das proteínas da via IGF1-PI3k-AKT-mTOR indicam a importância dessa cascata de sinalização no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento físico. Portanto, a análise dessa via serve como aparente marcador biológico de hipertrofia cardíaca fisiológica em decorrência do estímulo do treinamento físico.

## **1.6- Tratamentos não farmacológicos após infarto do miocárdio**

O remodelamento ventricular cardíaco é um evento pós-infarto que pode ser modificado a partir de intervenções terapêuticas. A sobrevivência após um IM tem aumentado muito por terapias que possibilitam reduzir a extensão dos danos. Além da utilização de medicamentos ou, quando necessária, intervenção cirúrgica, tratamentos coadjuvantes como o exercício físico e a terapia celular têm sido utilizados no tratamento de insuficiência cardíaca, com potencial de melhora da função após a lesão isquêmica (Shephard et al., 1999; Wollert & Drexler, 2005; Shah & Shalia, 2011; Ellison et al., 2012).

O exercício físico representa hoje uma alternativa de terapia não farmacológica no tratamento de diversas patologias cardiovasculares. Estudos populacionais apontam que níveis regulares de atividade física são inversamente relacionados à mortalidade

(Pate et al., 1995; Haskell et al., 2007; Nocon et al., 2008). Estudos experimentais apontam para um efeito cardioprotetor do exercício físico após IM (Shephard et al., 1999; Wisloff et al., 2002; de Waard et al., 2007; Wu et al., 2009; Xu et al., 2008; Bito et al., 2010; Jorge et al., 2011; Yamashita et al., 2001; Yengo et al., 2012).

Os benefícios cardiovasculares do exercício são multifatoriais e incluem importantes efeitos sistêmicos na musculatura esquelética, vasculatura periférica, metabolismo geral, capacidade pulmonar, débito cardíaco, elevação do  $VO_{2max}$  e extração de oxigênio pelos tecidos. Tomadas em conjunto, essas alterações são responsáveis por aumentar a tolerância ao esforço, que é reduzida em decorrência do IM e melhorar a saúde geral e a qualidade de vida dos pacientes, além de reduzir a morbidade e mortalidade (Paffenbarger et al., 1993, Blair et al., 1995; Belardinelli et al., 1999; Piegas et al., 2009; Mann & Rosenzweig, 2012; Ghorayeb et al., 2013).

Sugere-se que os mecanismos cardioprotetores do exercício pós-infarto sejam explicados, dentre outros fatores, por um melhor balanço entre síntese e degradação de colágeno, resultando em menor deposição da proteína, tanto na região de cicatriz quanto no miocárdio remanescente na região remota. Por consequência, maior complacência e melhor função cardíaca são encontradas nos corações infartados dos animais treinados (Orenstein et al., 1995; de Waard et al., 2007; Xu et al., 2008; Jorge et al., 2011; Yengo et al., 2012).

Outra alteração estrutural importante obtida pelo treinamento físico após evento isquêmico é a angiogênese. O exercício aumenta o número de microvasos e capilares, aumenta a expressão de fatores angiogênicos como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e seus receptores Flt-1 e Flk-1, aumenta o número de células progenitoras endoteliais circulantes e melhora a disponibilidade de óxido nítrico, um potente vasodilatador. Como resultado, tem-se uma melhor oferta de oxigênio ao miocárdio, contribuindo para melhor metabolismo cardíaco e maior tolerância ao esforço (Hambrecht et al., 2003; Laufs et al., 2004; Wu et al., 2009; Craenenbroeck et al., 2010).

O treinamento físico aeróbico é capaz de restaurar parte dos danos contráteis causados pelo IM. Aumento na amplitude de contração, redução para o tempo de relaxamento, melhoras no transiente de  $Ca^{2+}$  e na expressão das proteínas reguladoras do  $Ca^{2+}$  são algumas das alterações responsáveis pela melhor contratilidade celular

(Zhang et al., 2000; Wisloff et al., 2002; de Waard et al., 2007; Ait Mou et al., 2009; Bito et al., 2010).

Os benefícios do treinamento físico aeróbico de intensidade moderada após o IM estão bem documentados, entretanto, o momento ideal pós-evento cardíaco para iniciar o programa de reabilitação através do exercício ainda gera debates (de Waard et al., 2007; Ait Mou et al., 2009; Bito et al., 2010; Jorge et al., 2011). Uma recente meta-análise mostrou que as maiores mudanças no remodelamento do VE e na reabilitação da capacidade cardiopulmonar de pacientes infartados foram obtidas quando os programas de treinamento físico começaram na fase aguda (aproximadamente 1 semana) após o IM; e que, se iniciado após a fase de cicatrização (após 1 mês), os efeitos benéficos do treinamento na fração de ejeção, diâmetro sistólico final e pico de  $VO_{2\text{máx}}$  são menos evidentes. Em adição, o exercício não aumentou a incidência de eventos cardíacos adversos na fase aguda pós IM (Zhang et al., 2015). Esses dados reforçam os achados de outra meta-análise na qual concluiu que os maiores benefícios do treinamento físico no remodelamento cardíaco em pacientes pós-IM ocorrem quando a intervenção é iniciada por volta de 1 semana após o IM e com duração superior a 3 meses (Haykowsky et al., 2011).

Em experimentos animais, o exercício voluntário iniciado 24 horas após IM não influenciou o tamanho do infarto e as dimensões do VE, porém melhorou a fração de encurtamento e a congestão pulmonar (de Waard et al., 2007) e restaurou a contração celular para os valores de normalidades, devido a mudanças na sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^+$  (Bito et al., 2010). Outros estudos prévios mostraram que o exercício iniciado 24 horas após IM atuou negativamente sobre a geometria ventricular, causando afinamento do tecido cicatricial (Hammerman et al., 1983; Pfeffer et al., 1990) ou não provocou efeito no tamanho e na expansão do tecido infartado (Hochman et al., 1986), porém a função cardíaca não foi avaliada nesses últimos trabalhos. Poucos ainda são os estudos que abordaram a utilização do exercício nas horas iniciais após infarto, necessitando, portanto de maiores investigações sobre o momento ideal de se iniciar o treinamento.

Outro tratamento que tem sido empregado no IM é a terapia com células-tronco. Esse é um tipo peculiar de célula com potencial de renovar e originar tipos celulares diferenciados, sem possuir função específica até receber um sinal (tumor, trauma, inflamação, necrose, lesão) do ambiente, que a direcionará a uma diferenciação especializada (Kirschstein et al., 2001).

Um tipo específico de células-tronco de muito interesse em pesquisas são as células-tronco mesenquimais (CTM). Essas são obtidas do compartimento estromal da medula óssea e são pluripotentes, podendo se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos e cardiomiócitos. São fáceis de serem obtidas, podem ser criopreservadas e, por serem pouco imunogênicas, podem ser utilizadas em transplantes alogênicos com baixa taxa de rejeição (Barry & Murphy, 2004; Pittenger & Martin, 2004, Pittenger et al., 1999; Shah & Shalia, 2011).

A terapia de transplante de células-tronco tem mostrado potencial para melhorar a função ventricular após lesão isquêmica cardíaca. O mecanismo mais aceito da ação das células transplantadas aponta para um efeito parácrino nos cardiomiócitos, mais que a transdiferenciação (Pittenger & Martin, 2004; Wollert & Drexler, 2005; Gneccchi et al., 2008; Shah & Shalia, 2011).

A terapia com CTM é capaz de atenuar a disfunção contrátil pelo aumento da expressão de proteínas contráteis (troponina T e tropomiosina), redução do afinamento da parede infartada do ventrículo e atenuação do diâmetro do ventrículo esquerdo (Shake et al., 2002; Berry et al., 2006). Além disso, o tratamento de transplante celular foi capaz de estimular a proliferação e diferenciação de células tronco endógenas cardíacas c-Kit<sup>+</sup> e aumentar o número de miócitos em mitose (Gneccchi et al., 2008; Hatzistergos et al., 2010). Outro efeito relatado é a redução do tamanho do infarto e da resposta inflamatória (Lee et al., 2009). Esses efeitos são explicados, em parte, pela redução da fibrose e da apoptose, além da estimulação da miogênese e angiogênese (Nagaya et al., 2004; Berry et al., 2006; Li et al., 2011). Essas adaptações, em conjunto, geram modificações hemodinâmicas, tais como aumento da fração de ejeção e de encurtamento, aumento do fluxo sanguíneo e redução do volume sistólico e diastólico final e aumento da pressão sistólica do ventrículo esquerdo (Berry et al., 2006; Li et al., 2011; Wang et al., 2012).

Estudos clínicos em pacientes infartados têm mostrado avanços promissores na eficácia e segurança da terapia celular. A injeção intravenosa de CTM foi capaz de reduzir episódios de taquicardia ventricular, melhorar o volume expiratório final, demonstrando melhor capacidade funcional pulmonar, além de apresentar melhor fração de ejeção com menor remodelamento cardíaco (Hare et al., 2009). Indivíduos que receberam células-tronco derivadas da medula óssea de forma autóloga e por injeção intracoronariana aumentaram o tempo de exercício físico (Lunde et al., 2007; Jiang et al., 2012), o pico de frequência cardíaca e o pico do VO<sub>2</sub> (Lunde et al., 2007;

Straburzynska-Migaj et al., 2012). O transplante intracoronariano de CTM reduziu o tamanho do infarto, aumentou a fração de ejeção do ventrículo esquerdo e melhorou o  $VO_{2max}$  em pacientes infartados (Strauer et al., 2011). O efeito terapêutico da infusão transendocárdica de células tronco derivadas da medula óssea se manteve por tempo prolongado, maior que 12 meses, mantendo melhores padrões de perfusão miocárdica e capacidade física em comparação aos controles (Perin et al., 2004).

Apesar dos resultados das pesquisas com células-tronco avançarem no quesito segurança e eficácia para tratamento de lesões cardíacas, algumas questões permanecem sem resposta, tais como: tipo celular e a dosagem adequada, meio de infusão mais eficaz e janela terapêutica mais apropriada. Além disso, poucos são os estudos que investigaram a associação de tratamentos coadjuvantes como o exercício físico e terapia celular no coração isquêmico. Sendo assim, estudos experimentais que identifiquem estratégias para potencializar a ação da terapia celular visando melhorar seu efeito terapêutico devem ser realizados.

O treinamento físico, que já se encontra bem estabelecido como terapia coadjuvante no tratamento do IM, associado ao transplante celular, foi benéfico em reduzir o tamanho do infarto e parâmetros de fibrose cardíaca, além de aumentar a função cardíaca através da fração de ejeção (Cosmo et al., 2012). Trabalhos do nosso laboratório mostraram que a associação: treinamento físico e terapia celular iniciados 24 horas após o IM, quando avaliados isoladamente, promoveram adaptações benéficas em parâmetros cardiovasculares e propriedades mecânicas de cardiomiócitos do VE e VD. No entanto, a associação dos tratamentos não resultou em efeito sinérgico no órgão (Belfort, 2014; Lavorato, 2014). Em níveis celulares, a associação do treinamento físico à terapia com CTM reduziu o tempo para o pico de contração e o tempo para 50% do decaimento do  $Ca^{2+}$  e aumentou a amplitude de transiente  $Ca^{2+}$ , bem como a expressão da proteína regulatória do  $Ca^{2+}$  fosfolamban (FLBser16) (Lavorato, 2014).

Apesar dos efeitos benéficos do exercício físico regular e do transplante de células-tronco sobre a estrutura e função do coração infartado, ainda se faz necessário investigar o efeito associado desses tratamentos sobre estrutura e função cardíaca no processo de remodelamento após IM. Dessa forma, espera-se que a associação dos dois tratamentos possa potencializar os efeitos positivos sobre o coração isquêmico. Além disso, apesar dos resultados a respeito dos efeitos do exercício iniciado precocemente após um evento cardíaco serem controversos, especula-se que quanto mais rápido for iniciado o treinamento, bem como a terapia celular, maiores serão as chances de atenuar

os efeitos deletérios do IM, visto que o processo cicatricial ainda não está completo. Dessa forma, as alterações benéficas passariam pela redução da formação de cicatriz no coração. Este estudo foi realizado para testar a hipótese de que o exercício físico iniciado 24 horas pós-infarto, associado à terapia com CTM poderia afetar de modo benéfico o remodelamento e a função cardíaca.

## **2- OBJETIVO**

Investigar os efeitos da associação do exercício físico aeróbio iniciado 24 horas após o infarto com a terapia com células-tronco mesenquimais sobre a estrutura e função cardíaca de ratos submetidos ao infarto do miocárdio experimental.

### **3- METODOLOGIA**

#### **3.1-Aspectos éticos**

O experimento foi conduzido de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa (parecer nº 05/2013).

#### **3.2-Animais e grupos experimentais**

Setenta e dois ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com 30 dias de idade e massa corporal de 146 g, oriundos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, MG, foram utilizados. Os animais foram alojados em caixas de polietileno, em grupos de cinco animais por caixa, receberam ração comercial para roedores e água ad libitum. O ambiente foi mantido com temperatura média de 22°C e regime de luminosidade de 12/12 horas claro/escuro. O peso corporal foi obtido no início e ao final do período experimental, utilizando-se balança eletrônica digital (Rochelle, Brasil).

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em seis grupos experimentais, com 12 animais em cada:

- SED SH (sedentário sham, n=12): animais não submetidos ao programa de corrida em esteira e submetidos à cirurgia simulada do infarto;
- SED IM (sedentário infartado, n=12): animais não submetidos ao programa de corrida em esteira e submetidos à cirurgia do infarto;
- SED IM CT (sedentário infartado + terapia com células-tronco, n=12): animais não submetidos ao programa de corrida em esteira, submetidos à cirurgia do infarto e terapia com células-tronco;
- EX SH (exercitado sham, n=12): animais submetidos ao programa de corrida em esteira e submetidos à cirurgia simulada do infarto;
- EX IM (exercitado infartado, n=12): animais submetidos ao programa de corrida em esteira e submetidos à cirurgia do infarto;

- EX IM CT (exercitado infartado + terapia com células tronco, n=12): animais submetidos ao programa de corrida em esteira, submetidos à cirurgia do infarto e terapia com células-tronco.

### **3.3- Anestesia**

Os animais foram submetidos à anestesia para realização de procedimentos como exames e cirurgia. Os animais foram anestesiados em câmara de indução com isoflurano 3% e oxigênio 100% em fluxo constante de 1L/minuto. Para análise ecocardiográfica e eletrocardiográfica, o agente anestésico foi administrado por um período aproximado de 3 minutos. Para a manutenção da anestesia o isoflurano foi mantido a 1,5% através de cone nasal pequeno (adaptado para ratos) durante um período de 10 a 12 minutos. A temperatura corporal foi monitorada e controlada durante o exame através de bolsas com água aquecida a 37°C. Para a cirurgia de indução do infarto, depois de anestesiados na câmara de indução e uma vez inconscientes, foram posicionados em decúbito dorsal para proceder-se a intubação endotraqueal. A frequência de 20 movimentos respiratórios/minuto e a ausência de tônus mandibular serviram de parâmetros para determinar o momento ideal da intubação. Para intubação orotraqueal foi usado sistema para pequenos animais (BioLite, BioTex, Houston, TX, USA). Um cateter intravenoso de 16 a 18 gauges e 2,54 cm de comprimento foi utilizado como sonda. Imediatamente, o tubo endotraqueal foi conectado ao ventilador (Inspira Advanced Safety Single Animal Pressure/Volume Controlled Ventilators, Harvard Apparatus, Massachusetts, USA) e a frequência respiratória estabelecida entre 50 e 60 movimentos/minuto, com pressão inspiratória entre 16 e 18 cm H<sub>2</sub>O e fluxo de oxigênio de 550 mL/min. A anestesia foi mantida com isoflurano diluído em oxigênio 100%, com concentração ajustada para manter o plano anestésico adequado.

### **3.4- Indução do infarto do miocárdio**

#### **3.4.1. Toracotomia e infarto do miocárdio**

Os animais anestesiados foram mantidos em decúbito dorsal com os quatro membros imobilizados sobre uma caixa de polietileno, seguido de ampla tricotomia e assepsia da região torácica. O acesso à cavidade torácica deu-se mediante esternotomia mediana de aproximadamente 2 cm de extensão, mantendo-se intactos o manúbrio e o xifoide. Em seguida, afastou-se gentilmente os pulmões com o auxílio de um cotonete umedecido para facilitar a visualização, o pericárdio foi então seccionado, expondo o

coração. A identificação do local para realização da ligadura da artéria coronária anterior descendente esquerda foi feita tendo como referência o apêndice atrial esquerdo. A ligadura foi feita criteriosamente a uma distância de aproximadamente 2 mm do apêndice atrial esquerdo, com fio monofilamentar 6-0. O ponto deveria ser profundo o suficiente para assegurar que a artéria fosse bloqueada. Prontamente, a ligadura bem sucedida causava empalidecimento da região inferior do coração. O eletrocardiograma (ECG) (PowerLab device, ML865, ADInstruments, São Paulo, Brasil) foi realizado para documentar as alterações eletrofisiológicas decorrentes da ligadura da artéria durante o transoperatório. O IM foi considerado bem sucedido após identificação da elevação do segmento ST.

A cavidade torácica foi fechada por duas camadas de suturas com fio de náilon 4.0: a muscular e a pele. Antes de completar a última sutura do tórax, uma pressão positiva ao final da expiração foi exercida e mantida por aproximadamente 2 segundos, com a finalidade de expandir os pulmões ao máximo. No transoperatório, a temperatura corporal foi mantida em 37,5°C, por meio da transferência de calor oriundo de bolsas de água aquecidas e colocadas dentro da caixa usada para contenção.

A simulação da cirurgia realizada nos grupos SHAM consistiu do mesmo procedimento cirúrgico, no entanto, sem a ligadura da artéria.

### **3.4.2 Cuidados pós-operatórios**

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

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

### **3.5- Obtenção e cultura das células-tronco mesenquimais (CTM)**

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

Realizou-se desarticulação e remoção dos fêmures de forma asséptica. As epífises distais foram seccionadas, sendo o canal medular lavado com meio de

crescimento DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) baixa glicose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/EUA), acrescido de 20% de soro fetal bovino (Gibco), 50 mg/L de gentamicina (Sigma), 100000 U/L de penicilina G potássica (Sigma) e 1,5 mg/L de anfotericina B (Sigma), com auxílio de uma seringa de 10 mL e agulha de 25 G.

O material obtido foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. O precipitado contendo a fração celular foi ressuscitado em meio DMEM completo e plaqueado na concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL, em frascos de cultura celular de 75 mm<sup>2</sup> (Sarstedt, Numbrecht, Alemanha), mantidos em estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

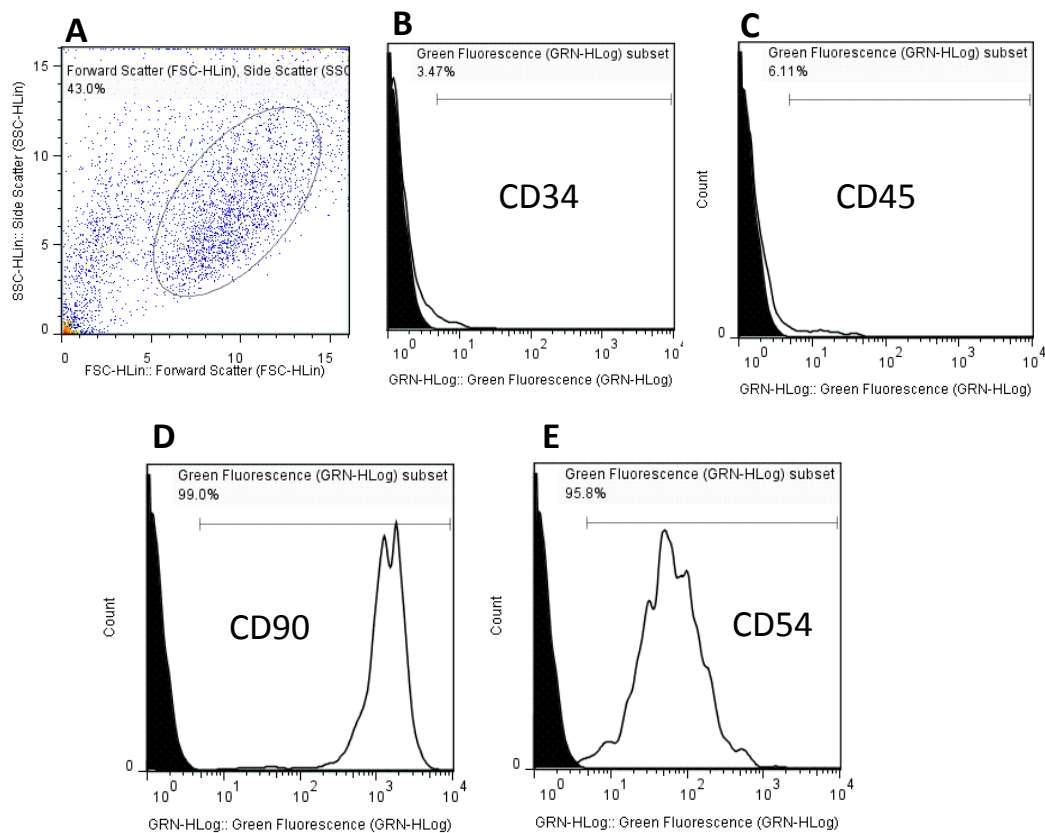
As culturas foram monitoradas diariamente com auxílio de microscópio invertido de contraste de fase e o meio de cultura foi trocado a cada três ou quatro dias, de acordo com a necessidade. Quando as células atingiram em torno de 80-90% de confluência, realizou-se o desprendimento do frasco de cultura por digestão enzimática com solução de 0,25% tripsina/EDTA (Sigma) e novo plaqueamento, permitindo a purificação, o cultivo e a expansão da população. As células foram mantidas em cultura com repiques sucessivos no máximo até a quarta passagem, a fim de evitar a senescência proliferativa, quando, então, as células foram utilizadas (Zuk et al., 2002).

### **3.5.1. Caracterização celular**

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

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

As amostras foram analisadas usando citômetro de fluxo FACScan e software CellQuest®, obtendo-se 30000 eventos por amostra testada. Os resultados da caracterização celular realizada por meio de citometria de fluxo estão apresentados na Figura 1.



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

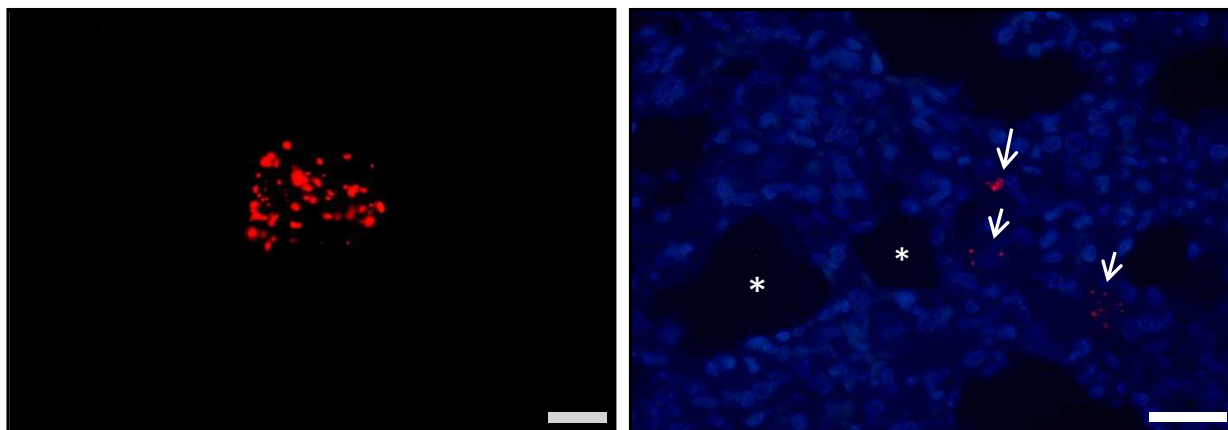
### 3.5.2. Nanomarcagem das CTM

Quatro horas antes do transplante, células da quarta passagem foram incubadas por 45 minutos, a  $37^{\circ}\text{C}$ , com Qtracker (Cell Labeling 655 Invitrogen, California, EUA), segundo recomendações do fabricante. As células marcadas foram tripsinizadas e centrifugadas a  $22^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos em 1500 rpm para a obtenção do pellet celular. Esse

foi ressuspendido em PBS e alíquotas de  $1 \times 10^6$  células foram preparadas em 1,0mL de PBS, centrifugadas e armazenadas em caixa de isolamento térmico até o momento da aplicação intravenosa. Uma dose foi preparada para avaliação à fresco em microscópio de fluorescência para comprovar a eficácia da nanomarcção, antes de ser injetada nos animais. A figura 2A representa essa marcação em amostras a fresco, antes de serem injetadas nos animais.

### **3.5.3. Transplante das CTM e identificação das CTM nos tecidos**

A suspensão de  $1 \times 10^6$  células/mL foi injetada imediatamente após o IM, com auxílio de cateter intravenoso 24 gauges inserido na veia lateral da cauda. Cinco animais que receberam as CTM marcadas com QTracker foram eutanasiados 18h após o infarto e fragmentos dos tecidos do coração, baço e pulmão foram coletados com o objetivo de rastrear o destino das CTM transplantadas. As amostras foram fixadas em formalina de Carson por 24 horas. Transcorrido esse período, o material foi desidratado, diafanizado e incluído em parafina. Foram feitas secções transversais, de 5  $\mu$ m de espessura, com intervalo de 50  $\mu$ m entre elas. Foram acondicionados seis cortes em cada lâmina histológica, oito lâminas por animal. As lâminas foram montadas com meio de montagem contendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen, CA, EUA) para contra-coloração dos núcleos. A fluorescência do QTracker foi avaliada utilizando o filtro de excitação WG e para evidenciação do núcleo foi utilizado o filtro WU em microscópio de fluorescência (Olympus BX-60, Tóquio, Japão). As células transplantadas com o marcador Q-tracker foram encontradas apenas nos pulmões dos animais 18 horas após seu transplante e estão representadas na figura 2B.



**Figura 2:** Imagens de microscopia de fluorescência. (A) Fotomicrografia de CTM nanomarcada com Q-tracker, comprovando os nanocristais citoplasmáticos fluorescentes emitidos pela célula em suspensão antes de ser injetada nos animais. Barra: 10 $\mu$ m. (B) Identificação de células transplantadas presentes no pulmão 18 horas pós-infarto. Os asteriscos indicam os alvéolos pulmonares, as setas apontam as CTM e os núcleos foram contra-corados com DAPI em azul. Barra: 50 $\mu$ m.

### 3.6- Protocolo de treinamento físico e teste de capacidade de corrida

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

Antes do início do treinamento, todos os ratos foram submetidos a um período de adaptação para se familiarizarem com o protocolo de corrida, caminhando diariamente à velocidade de 5 m/min, 5 min/dia, 0° de inclinação, 5 dias consecutivos, durante o período de aclimatação. Após 48 horas, realizou-se a cirurgia de indução do infarto e o transplante das células-tronco. Vinte e quatro horas após indução do IM, da cirurgia simulada e da infusão das CTM, os animais dos grupos EX SH, EX IM e EX IM CT iniciaram o programa de treinamento, correndo a uma velocidade considerada leve (7-10m/min) iniciando o 1° dia correndo durante 20 minutos e completando a semana de treinamento com 50 minutos de exercício. No sexto dia, os animais foram submetidos ao teste na esteira para determinação da velocidade máxima de corrida

(VMC), a qual foi utilizada como parâmetro de intensidade do programa de treinamento.

Os animais iniciaram a corrida à velocidade de 5 m/min, 0° de inclinação, sendo que a velocidade da esteira foi aumentada em 3 m/min a cada 3 minutos até a fadiga (de acordo com Jorge et al., 2011 e Campos et al., 2012). O momento da fadiga foi definido e o teste interrompido quando os animais não mantiveram a corrida de acordo com a velocidade da esteira (Trueblood et al., 2004). A capacidade de corrida foi avaliada dois dias antes, sete dias após o IM e a cada quatro semanas de treinamento para ajuste da velocidade de corrida dos animais e ao final da 12ª semana do protocolo de treinamento.

A velocidade de corrida no treinamento foi progressivamente aumentada de modo que permanecesse em 60% da velocidade máxima de corrida durante todo o período experimental de 12 semanas. Os animais dos grupos não treinados em esteira rolante (SED SH, SED IM e SED IM CT) foram igualmente manuseados e colocados na esteira rolante 3 dias/semana, 10 min/dia, 0° de inclinação, à velocidade de 5 m/min. Após 48 horas do último teste de capacidade física, no final da 12ª semana de treinamento, os animais foram eutanasiados.

A frequência cardíaca de repouso (FCR) foi obtida a partir do eletrocardiograma ao final do período experimental. Os animais foram anestesiados, conforme item 3.3. O eletrocardiograma (DII) foi feito usando o sistema de aquisição de dados PowerLab® (AD Instr., SP, Brasil) e os dados foram analisados utilizando o programa Lab Chart Pro® (AD Instr. Lab Chart 7, SP, Brasil). A FCR foi obtida pela média de cinco ciclos cardíacos consecutivos.

### **3.7- Análise ecocardiográfica**

Para essa análise foram utilizados seis animais escolhidos aleatoriamente por grupo. Ao final do período experimental, os animais foram anestesiados conforme item 3.3.

O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado por um veterinário cardiologista. O exame incluiu estudos bidimensionais (2D) com taxa de amostragem rápida (frame rate) de 120 fps e modo-M, usando o sistema de ultrassom (MyLab™30 – Esaote, Genoa, Itália) com transdutor phased array de 11,0 MHz de frequência nominal. Os ecocardiogramas transtorácicos bidimensionais (2D) e modo-M foram obtidos com sweep speed de 200 mm/s e ajustados de acordo com a frequência cardíaca. As imagens foram coletadas de acordo com as recomendações da Sociedade Americana

de Ecocardiografia e armazenadas para análise posterior. Cada parâmetro foi mensurado em três ciclos cardíacos distintos e a média das medidas foi utilizada para as análises estatísticas.

A espessura das paredes posterior e anterior do ventrículo esquerdo e do septo interventricular (final da diástole e final da sístole), as dimensões da câmara do ventrículo esquerdo e as frações de ejeção e de encurtamento foram mensuradas usando um método modificado preconizado pela Sociedade Americana de Ecocardiografia, durante três ciclos cardíacos consecutivos (Sahn et al., 1978). Os registros em modo-M foram analisados usando um sistema de análise disponível no próprio aparelho.

### **3.8- Biometria cardíaca e conteúdo de água pulmonar**

Após efetuar as medidas do ecocardiograma, procedeu-se a eutanásia por sobredose anestésica de isoflurano. Os corações (n=6 por grupo) foram retirados e lavados com solução salina, dissecados e pesados. Para cálculo do volume cardíaco os corações foram submersos em uma proveta milimetrada contendo solução salina e o conteúdo de líquido deslocado foi utilizado como valor de volume do órgão. Foram feitas medidas com paquímetro no eixo longitudinal e transversal para o cálculo do tamanho do coração. O peso do coração e o índice cardiosomático (peso do coração dividido pelo peso corporal final) foram avaliados. Esses dados em conjunto foram utilizados como índices de hipertrofia cardíaca.

Para determinar se os ratos com IM desenvolveram edema pulmonar, foi avaliado o teor de água no pulmão. O conteúdo hídrico dos órgãos foi obtido a partir dos seus pesos úmidos e secos. O peso úmido dos pulmões foi obtido em balança de alta precisão, logo após a remoção do órgão da cavidade torácica e dissecação dos tecidos anexos. Os pulmões foram identificados, levados para uma estufa (MA035, Marconi Equipamentos, SP, Brasil) para desidratação a 80°C por 12 horas e novamente pesados para obtenção do peso seco (conforme Yeğinsu & Ergin, 2010). Obtidos os pesos secos do pulmão, o teor de água (%H<sub>2</sub>O) de cada órgão foi definido pela equação (conforme descrito por Portes e Tucci 2006):

$$\% \text{ H}_2\text{O} = (\text{Peso úmido} - \text{Peso seco}) / \text{Peso úmido} \times 100$$

### **3.9- Análise histológica do tamanho do infarto, conteúdo de colágeno e percentual de vasos no tecido cardíaco**

Os corações (n=6 por grupo) foram seccionados para avaliação histológica da extensão do infarto, conteúdo de colágeno e densidade vascular. Para tal, o coração foi cortado em três secções transversas: ápice, anel mediano (aproximadamente 3mm) e base. O anel mediano foi imediatamente fixado em formalina de Carson por 24 horas e depois submetido ao processamento histológico de rotina (desidratação, diafanização e infiltração) para inclusão em parafina. Em seguida, as secções foram cortadas em 5 µm de espessura, com intervalo de 50 µm, utilizando um micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045 Multicut, Alemanha). Para cada análise foram montadas 2 lâminas histológicas, cada uma contendo 6 cortes. Para análise da extensão do infarto, os cortes foram corados com Picosirius Red. Foi utilizado um scanner (HP deskjet F380, EUA) com aumento de 600 dpi para captura das imagens. As circunferências do endocárdio e epicárdio do tecido infartado e do ventrículo esquerdo foram determinadas com o auxílio de um software de análise de imagens (Image-Pro Plus 4.5; Media Cybernetics; Silver Spring, USA). Utilizou-se a ferramenta “create trace feature” para determinar os seguintes parâmetros: perímetro da cicatriz endocárdica (PCEN); perímetro da cicatriz epicárdica (PCEP); perímetro endocárdico do ventrículo esquerdo (PENVE); perímetro epicárdico do ventrículo esquerdo (PEPVE). O cálculo da porcentagem de infarto foi realizado utilizando a seguinte fórmula (Mulder et al., 2002):

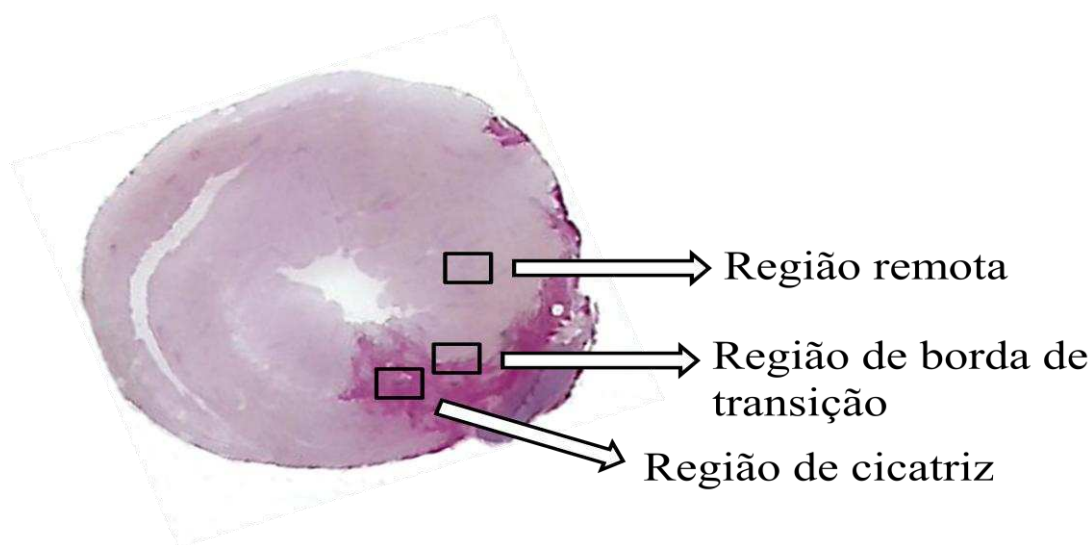
$$(PCEN + PCEP / PENVE + PEPVE) \times 100$$

O tamanho do infarto dos grupos foi calculado pela média de todos os cortes e expresso como porcentagem do ventrículo esquerdo.

Para quantificação do colágeno no tecido cardíaco, as imagens foram capturadas utilizando uma câmera (Spot Insight Color, Diagnostic Instruments - EUA) acoplada a um microscópio de luz polarizada (Olympus AX-70®, Tóquio, Japão), na objetiva de 10X. Três regiões distintas do miocárdio foram analisadas: região de cicatriz, região da borda de transição e região remota ao infarto (conforme figura 3), totalizando 60 imagens/região/grupo. A análise do conteúdo de colágeno presente em cada imagem foi realizada com o auxílio de um software de análise de imagens (Image-Pro Plus 4.5; Media Cybernetics; Silver Spring, USA) utilizando-se da ferramenta grid mask, na qual um sistema de teste de 88 pontos foi criado. Foram contabilizados os pontos de intersecções coincidentes com o colágeno.

Para análise da densidade vascular os cortes foram corados com a técnica do ácido periódico de Shiff (PAS) e as imagens capturadas utilizando-se uma câmera (Olympus QColor- 3®, Tóquio, Japão) conectada a um microscópio de luz (Olympus

BX-60®, Tóquio, Japão) na objetiva de 40X. Três regiões distintas do miocárdio foram analisadas: região de cicatriz, região da borda de transição e região remota ao infarto (conforme figura 3), totalizando 60 imagens/região/grupo. A contagem dos vasos presentes em cada imagem foi realizada com o auxílio de um software de análise de imagens (Image-Pro Plus 4.5; Media Cybernetics; Silver Spring, USA) utilizando-se da ferramenta grid mask, na qual um sistema de teste de 88 pontos foi criado. Foram contabilizados os pontos de intersecções coincidentes com os vasos: luz e parede de arteríolas, vênulas e capilares.



**Figura 3:** Imagem representativa de um corte transversal do coração delimitando as regiões escolhidas do ventrículo esquerdo para análise de conteúdo de colágeno e de vasos sanguíneos.

### 3.10- Comprimentos, largura e volume de cardiomiócitos

As dimensões dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo da região remota ao infarto foram avaliadas ( $n = 6$  por grupo), num total de 60 células por animal, conforme descrito por Carneiro-Junior (2009). Resumidamente, os miócitos cardíacos foram isolados através de dispersão enzimática, acomodados em uma câmara experimental e banhados com solução de perfusão tampão à temperatura ambiente ( $\sim 25^{\circ}\text{C}$ ). As imagens das células foram visualizadas horizontalmente, com aumento de 400x - lente objetiva de imersão em óleo (S Fluor, 40x, Nikon, EUA) no monitor de um microcomputador através de uma câmera (Myocam, Ionoptix, EUA) acoplada a um microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100, EUA), utilizando-se um programa de captação de imagens (M-Vision 5XX, Ionoptix, EUA). O comprimento celular foi determinado medindo-se a imagem da célula gerada no monitor, desde a borda direita até a borda esquerda. A

largura celular foi determinada medindo-se a imagem gerada no monitor, desde a borda superior até a borda inferior, no ponto médio dos miócitos cardíacos (conforme figura 4). Para a realização das medições do comprimento e da largura dos miócitos cardíacos, utilizou-se uma régua graduada. Na calibração do sistema de captação de imagens cada centímetro correspondia a 12  $\mu\text{m}$ . Somente foram escolhidas para as medições, células que estavam em boas condições, com as bordas e as estriações sarcoméricas bem definidas e quiescentes. O volume celular, dado em picolitros, foi calculado usando-se a fórmula proposta por Satoh et al. (1996):

$$\text{Volume (pL)} = \text{comprimento } (\mu\text{m}) \times \text{largura } (\mu\text{m}) \times (7,59 \times 10^{-3} \text{ pL}/\mu\text{m}^2)$$

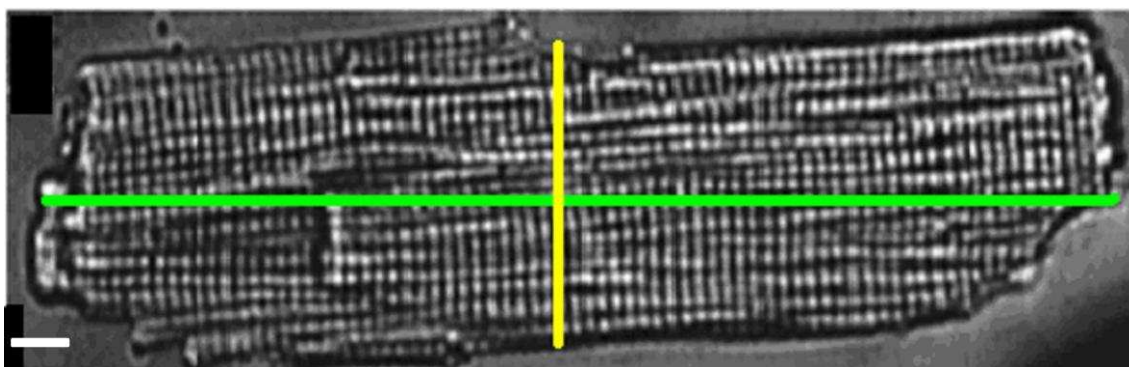


Figura 4. Representação dos pontos de medição da imagem dos miócitos cardíacos. Barra com comprimento de 10  $\mu\text{m}$ . As linhas indicam como foram obtidos o comprimento (verde) e a largura (amarelo) (Carneiro-Junior, 2009).

### 3.11- Expressão de proteínas cardíacas

A expressão das proteínas AKT (AKT total), AKTp (AKT fosforilada na serina 473), mTOR (mTOR total), mTORp (mTOR fosforilada na serina 2448), NFAT, Calcineurina e VEGF no tecido fragmentado do ventrículo esquerdo coletado da região do ápice do coração foi obtida por meio da técnica de eletroforese de proteínas, Western Blot.

Inicialmente, as amostras do ventrículo esquerdo foram homogeneizadas através de um homogeneizador de tecidos Polytron (PowerGen 125, Fisher Scientific) em tampão de extração com volume 9X seu peso [Manitol (210 mM; 19,1 g), Sacarose (70 mM; 12,0 g), MOPS (3-[N-morpholino] propanesulfonic acid) (5 mM; 0,523), EDTA (1 mM; 0,1861 g) e água destilada (500 mL)], acrescido de inibidor de protease (1:200) e inibidor de fosfatase (1:200). A homogeneização foi realizada por 30 segundos e o homogenato transferido para tubos de 1,5 ml. As amostras foram então centrifugadas por 20 minutos à 4°C a 12.000 rpm, sendo o sobrenadante transferido para novo tubo de

1,5 ml. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Biorad, EUA). As alíquotas dos homogenatos foram então armazenadas em freezer -80°C até serem utilizadas. As amostras foram diluídas em tampão de amostra.

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

A membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora (TBS e albumina 4%) a 4°C por 12 horas com agitação constante. Os seguintes anticorpos primários (Cell Signaling Technology) foram utilizados, com as respectivas diluições: anticorpo monoclonal para AKT1 (1:1000), anticorpo policlonal para AKT fosforilada na serina 473 (1:1000), anticorpo policlonal para mTOR (1:1000), anticorpo policlonal para mTOR fosforilada na serina 2448 (1:1000), anticorpo policlonal para NFAT1 (1:1000), anticorpo policlonal para Pan-Calcineurina A (1:1000), anticorpo monoclonal para VEGF (1:1000) e anticorpo monoclonal para GAPDH (1:10000). Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução TBS-T. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase em solução bloqueadora (TBS-T e albumina 4%) por uma hora e meia em temperatura ambiente com agitação constante. Os seguintes anticorpos secundários (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) foram utilizados, com as respectivas diluições: IgG anti-coelho (1:1000) ou anti-camundongo (1:1000). Após a incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução de TBS-T para remover o excesso de anticorpo. Por fim, a imuno-deteção das bandas protéicas foi realizada por meio do método de quimioluminescência (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ, EUA) e a intensidade das mesmas avaliada por análise densitométrica através do software ImageJ. A expressão das proteínas estudadas foi normalizada pela expressão de GAPDH da mesma amostra.

### 3.12- Análise da expressão gênica cardíaca

A expressão gênica relativa da  $\alpha$ -MCP ( $\alpha$ -miosina de cadeia pesada),  $\beta$ -MCP ( $\beta$ -miosina de cadeia pesada),  $\alpha$ -actina esquelética e FNA (fator natriurético atrial) no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais foram analisadas por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), conforme descrito por Soci et al. (2011). Foi realizada extração do RNA total de 100 mg de cada amostra em 1 ml de trizol (Invitrogen Life Technologies, Reino Unido) conforme a indicação do fabricante. A integridade da amostra foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0,5 $\mu$ g/mL de brometo de etídeo, durante 40 min a 100 V e avaliada pela intensidade das bandas do RNA ribossomal 28S e 18S.

Sucedeu-se a síntese de cDNA com 2  $\mu$ g de RNA total. As amostras foram incubadas por uma hora a 42° com 0,5  $\mu$ g/mL de oligo dT (12-18 pb) a 65°C por 5 min, para se obter a primeira fita de cDNA. A transcrição reversa das amostras foi realizada em um volume total de 20  $\mu$ L contendo 3U de RNAsin (PROMEGA, EUA), 10 mM de dNTPs, 0,1M de DTT, 1X tampão da enzima, e 2,5 U de SuperScript Reverse Transcriptase II (Invitrogen Life Technologies, Reino Unido) pelo período de 1 hora a 42°C; subsequentemente a temperatura foi elevada a 95°C por 5 minutos e as amostras rapidamente colocadas em gelo. As reações de RT-PCR foram realizadas pelo sistema da detecção do produto específico amplificado, no equipamento ABI 7700 (Applied-Biosystems, EUA) e com o composto fluorescente SYBR-Green I, conforme instruções do fabricante. A expressão do RNA mensageiro (RNAm) dos marcadores de hipertrofia cardíaca patológica foi realizada através dos primers, que foram desenhados usando-se o programa Primer 3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), sendo utilizados:

#### **$\alpha$ -MCP:**

sense: 5'-CGA GTC CCA GGT CAA CAA G-3',

antisense: 5'-AGG CTC TTT CTG CTG GAC C-3';

#### **$\beta$ -MCP:**

sense: 5'-CAT CCC CAA TGA GAC GAA G-3',

antisense: 5'-AGG CTC TTT CTG CTG GAC A-3';

#### **FNA:**

sense: 5'- CTT CGG GGG TAG GAT TGA C-3',

antisense: 5'-CTT GGG ATC TTT TGC GAT CT-3';

#### **$\alpha$ -actina esquelética:**

sense: 5'-ACC ACA GGC ATT GTT CTG GA-3',

antisense: 5'-TAA GGT AGT CAG TGA GGT CC-3';

**Ciclofilina:**

sense: 5'-AAT GCT GGA CCA AAC ACA AA -3',

antisense: 5'-CCT TCT TTC ACC TTC CCA AA -3'.

A expressão relativa dos genes estudados foi normalizada pela expressão do gene da Ciclofilina (DCT). A expressão gênica foi calculada usando-se as diferenças em valores de DCT entre as amostras (DDCT) e a equação  $2^{-DDCT}$ .

### **3.13- Análise estatística**

A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

Para a comparação do tamanho do infarto entre os quatro grupos experimentais infartados foi utilizada a ANOVA de duas vias, seguida do post-hoc de Tukey.

Para as comparações das demais variáveis entre os seis grupos experimentais foi utilizada a análise fatorial 2 (sedentário vs treinado) por 3 (sham vs infarto vs terapia celular), seguida do post-hoc de Tukey.

Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média (EPM). Foi utilizado o programa estatístico SigmaPlot, v.11.0. O nível de significância adotado foi de 5%.

## **4- RESULTADOS**

### **4.1- Peso corporal, peso do coração, índice cardiossomático, volume cardíaco e comprimento dos eixos longitudinal e transversal do coração.**

Os resultados referentes ao peso corporal, peso do coração, índice cardiossomático, volume cardíaco, comprimento dos eixos longitudinal e transversal do coração estão apresentados na tabela 1. No início do período experimental, nenhuma diferença estatística foi observada no peso corporal, fato que comprova a homogeneidade entre os grupos. Ao final do período experimental, não foram encontradas diferenças no peso corporal, volume cardíaco e comprimento do eixo longitudinal do coração, demonstrando que o infarto não foi capaz de alterar esses parâmetros e os tratamentos aplicados, terapia celular e exercício físico, também não modificaram essas características morfológicas. O fator infarto aumentou ( $p < 0,05$ ) o peso do coração (não infartados =  $1,47 \pm 0,05$  g vs infartados =  $1,75 \pm 0,05$  g) e o índice cardiossomático (não infartados =  $3,73 \pm 0,15$  mg/g vs infartados =  $4,45 \pm 0,14$  mg/g). Não houve efeito dos fatores tratamentos ou interação entre eles nesses parâmetros ( $p > 0,05$ ). O exercício aumentou o comprimento do eixo transversal do coração (sedentários =  $11,69 \pm 0,29$  mm vs exercitados =  $13,02 \pm 0,30$  mm) independentemente dos fatores infarto e terapia celular.

Tabela 1: Parâmetros biométricos de ratos infartados tratados com exercício físico e transplante de células-tronco mesenquimais.

	<b>SED SH</b>	<b>SED IM</b>	<b>SED IM CT</b>	<b>EX SH</b>	<b>EX IM</b>	<b>EX IM CT</b>
<b>PC INICIAL</b> (g)	149 ± 4,59	148 ± 7,61	144 ± 5,39	141 ± 6,85	147 ± 1,93	142 ± 4,72
<b>PC FINAL</b> (g)	387 ± 12,30	422 ± 8,36	419 ± 10,03	406 ± 11,48	396 ± 20,50	396 ± 14,02
<b>PESO COR</b> (g)	1,45 ± 0,08	1,81 ± 0,07*	1,91 ± 0,08*	1,50 ± 0,08	1,70 ± 0,09	1,76 ± 0,08
<b>ÍNDICE CARDIO-SOMÁTICO (mg/g)</b>	3,74 ± 0,20	4,28 ± 0,19	4,55 ± 0,23*	3,69 ± 0,20	4,29 ± 0,23 <sup>§</sup>	4,44 ± 0,21 <sup>§</sup>
<b>VC</b> (ml)	1,01 ± 0,06	1,13 ± 0,06	1,08 ± 0,06	0,95 ± 0,07	1,16 ± 0,06	1,17 ± 0,06
<b>CL</b> (mm)	16,56 ± 0,55	15,33 ± 0,39	15,28 ± 0,39	15,26 ± 0,42	16,23 ± 0,39	16,30 ± 0,39
<b>CT</b> (mm)	11,78 ± 0,51	11,20 ± 0,50	11,68 ± 0,50	12,02 ± 0,55	13,46 ± 0,50 <sup>#</sup>	13,60 ± 0,50 <sup>&amp;</sup>

Dados expressos em média ± EPM. N = 6 por grupo. SED SH (sedentário sham), SED IM (sedentário infartado), SED IM CT (sedentário infartado tratado células tronco), EX SH (exercitado sham), EX IM (exercitado infartado), EX IM CT (exercitado infartado tratado com células tronco). PC (peso corporal), Peso cor (peso do coração), VC (volume coração), CL (tamanho do coração no eixo longitudinal), CT (tamanho do coração no eixo transversal). \*diferente do grupo SED SH; <sup>§</sup>diferente do grupo EX SH; <sup>#</sup>diferente do grupo SED IM; <sup>&</sup>diferente do grupo SED IM CT. Nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

## 4.2- Eficiência do treinamento

Na figura 5 estão representados os resultados que comprovam a eficiência do treinamento físico aplicado. O exercício aumentou ( $p < 0,05$ ) a capacidade corrida dos animais dos grupos EX (sedentários =  $11,44 \pm 0,85$  min vs exercitados =  $22,83 \pm 0,85$  min) e diminuiu ( $p < 0,05$ ) a frequência cardíaca de repouso (sedentários =  $402,54 \pm 7,26$  bpm vs exercitados =  $346,10 \pm 8,01$  bpm). Não houve efeito do infarto, da terapia celular e da interação entre os fatores. A associação dos tratamentos não potencializou os resultados. O painel A mostra os resultados do teste de capacidade de corrida ao final do período experimental. No painel B estão apresentados os resultados da frequência cardíaca de repouso dos animais, realizado ao final do período experimental.

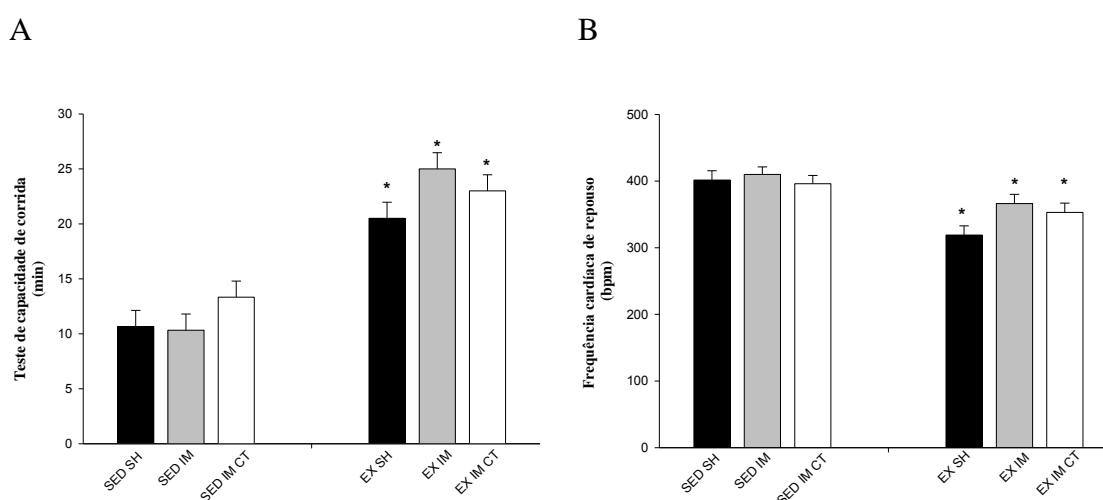


Figura 5: Desempenho físico e frequência cardíaca de ratos ao final do período experimental.  $N = 12$  por grupo. (A) Teste de capacidade de corrida (minutos) no final do período experimental. (B) Frequência cardíaca de repouso (batimentos por minuto) no final do período experimental. Dados expressos em média  $\pm$  EPM. SED SH (sedentário sham), SED IM (sedentário infartado), SED IM CT (sedentário infartado tratado células tronco), EX SH (exercitado sham), EX IM (exercitado infartado), EX IM CT (exercitado infartado tratado com células tronco). \* diferente dos respectivos grupos sedentários. Nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

## 4.3- Dados ecocardiográficos

Os resultados referentes à análise ecocardiográfica estão apresentados na tabela 2. O infarto, independente dos fatores terapia celular e exercício, aumentou ( $p < 0,05$ ) o diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE; não infartados =  $6,52 \pm 0,22$  mm vs infartados =  $7,83 \pm 0,23$  mm), o diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE; não infartados =  $3,99 \pm 0,23$  mm vs infartados =  $5,93 \pm 0,23$  mm), a espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo durante a diástole (EPPVED; não infartados =  $1,63 \pm$

0,07 mm vs infartados =  $1,99 \pm 0,07$  mm) e diminuiu a fração de ejeção (não infartados =  $72,56 \pm 1,80$  % vs infartados =  $53,94 \pm 1,83$  %), a fração de encurtamento (não infartados =  $37,19 \pm 1,11$  % vs infartados =  $24,81 \pm 1,13$  %), a espessura do septo interventricular durante a diástole (ESIVd; não infartados =  $1,72 \pm 0,08$  mm vs infartados =  $1,50 \pm 0,08$  mm) e durante a sístole (ESIVs; não infartados =  $2,72 \pm 0,12$  mm vs infartados =  $2,21 \pm 0,12$  mm). O exercício, independente dos fatores infarto e terapia celular, restaurou ( $p < 0,05$ ) os valores de fração de ejeção (sedentários =  $59,42 \pm 1,46$  % vs treinados =  $64,58 \pm 1,53$  %), fração de encurtamento (sedentários =  $28,37 \pm 0,90$  % vs treinados =  $31,54 \pm 0,94$  %), aumentou a espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo durante a sístole (EPPVEs; sedentários =  $2,59 \pm 0,07$  mm vs treinados =  $2,98 \pm 0,07$  mm) e a espessura do septo interventricular durante a sístole (ESIVs; sedentários =  $2,27 \pm 0,10$  mm vs treinados =  $2,62 \pm 0,10$  mm). Não houve interação entre os fatores e a combinação dos tratamentos falhou em potencializar os efeitos benéficos isolados dos tratamentos.

Tabela 2: Dados ecocardiográficos de ratos infartados tratados com exercício físico e transplante de células-tronco mesenquimais.

	SED SH	SED IM	SED IM CT	EX SH	EX IM	EX IM CT
<b>DDVE</b> (mm)	6,48 ± 0,38	8,12 ± 0,38*	7,91 ± 0,32*	6,55 ± 0,19	7,53 ± 0,35	8,19 ± 0,22 <sup>#</sup>
<b>DSVE</b> (mm)	4,21 ± 0,34	6,44 ± 0,44*	5,68 ± 0,32*	3,78 ± 0,23	5,42 ± 0,26 <sup>#&amp;</sup>	5,89 ± 0,19 <sup>#</sup>
<b>Fração de ejeção</b> (%)	69,92 ± 2,88	48,14 ± 3,71*	60,19 ± 2,38* <sup>&amp;</sup>	75,20 ± 1,15	59,75 ± 1,71 <sup>#&amp;</sup>	58,81 ± 1,53 <sup>#</sup>
<b>Fração de encurtamento</b> (%)	35,23 ± 2,14	21,51 ± 1,95*	28,35 ± 1,47* <sup>&amp;</sup>	39,14 ± 1,06	28,11 ± 1,15 <sup>#&amp;</sup>	27,38 ± 0,98 <sup>#</sup>
<b>EPPVEd</b> (mm)	1,66 ± 0,09	1,86 ± 0,10	1,84 ± 0,08	1,69 ± 0,06	2,12 ± 0,17 <sup>#</sup>	1,88 ± 0,12
<b>EPPVEs</b> (mm)	2,58 ± 0,14	2,50 ± 0,10	2,75 ± 0,08	2,91 ± 0,08	3,30 ± 0,22 <sup>&amp;</sup>	2,73 ± 0,14 <sup>¥</sup>
<b>ESIVd</b> (mm)	1,76 ± 0,14	1,40 ± 0,10	1,37 ± 0,11	1,68 ± 0,13	1,60 ± 0,08	1,54 ± 0,08
<b>ESIVs</b> (mm)	2,54 ± 0,19	1,93 ± 0,12*	2,34 ± 0,17	2,90 ± 0,25	2,48 ± 0,10 <sup>&amp;</sup>	2,50 ± 0,17

Os dados são expressos como média ± EPM. N = 6 por grupo. SED SH (sedentário sham), SED IM (sedentário infartado), SED IM CT (sedentário infartado tratado células tronco), EX SH (exercitado sham), EX IM (exercitado infartado), EX IM CT (exercitado infartado tratado com células tronco). DDVE = diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE = diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; EPPVEd = espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo durante a diástole; EPPVEs = espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo durante a sístole; ESIVd = espessura do septo interventricular durante a diástole; ESIVs = espessura do septo interventricular durante a sístole. \* diferente do grupo SED SH; <sup>#</sup> diferente do grupo EX SH; <sup>&</sup> diferente do grupo SED IM; <sup>¥</sup> diferente do grupo EX IM. Nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

#### 4.4- Avaliação histológica da extensão do infarto

A figura 6 apresenta imagens representativas dos corações dos seis grupos experimentais. O tamanho médio das áreas infartadas dos grupos experimentais está representado na figura 7. A terapia celular e o exercício reduziram ( $p < 0,05$ ) a área infartada. Houve interação entre os fatores e a associação dos tratamentos não diminuiu o tamanho do infarto nos animais do grupo EX IM CT em relação aos do grupo SED IM CT ou EX IM.

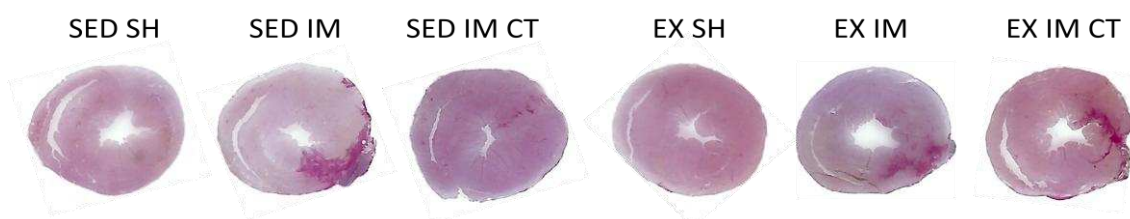


Figura 6: Fotomicrografias representativas de cortes transversais da parte média do coração coradas com Picrosirius red. N = 6 por grupo. SED SH (sedentário sham), SED IM (sedentário infartado), SED IM CT (sedentário infartado tratado células tronco), EX SH (exercitado sham), EX IM (exercitado infartado), EX IM CT (exercitado infartado tratado com células tronco).

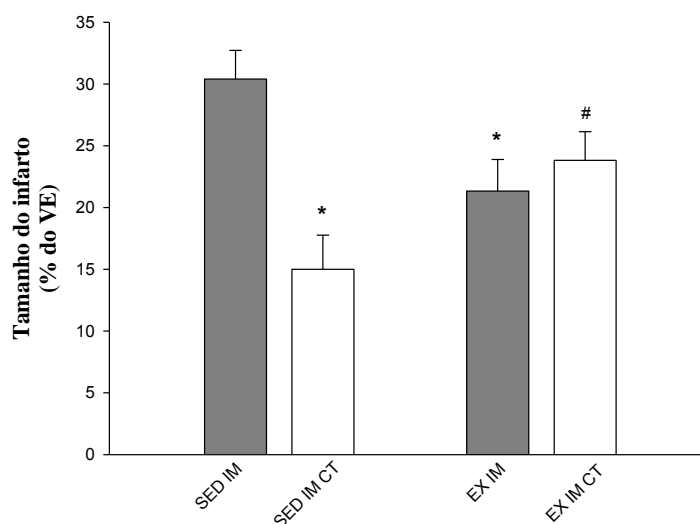


Figura 7: Tamanho do infarto nos grupos experimentais. N = 6 por grupo. Dados expressos em média  $\pm$  EPM. SED IM (sedentário infartado), SED IM CT (sedentário infartado tratado células tronco), EX IM (exercitado infartado), EX IM CT (exercitado infartado tratado com células tronco). \* diferente do grupo SED IM; # diferente do grupo SED IM CT. Nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

#### 4.5- Conteúdo de água no pulmão

O teor de água no pulmão é um indicativo de congestão pulmonar e indicativo da insuficiência da bomba cardíaca. Não houve efeito do infarto, da terapia celular e do exercício. Os dados do conteúdo de água pulmonar estão representados na figura 8.

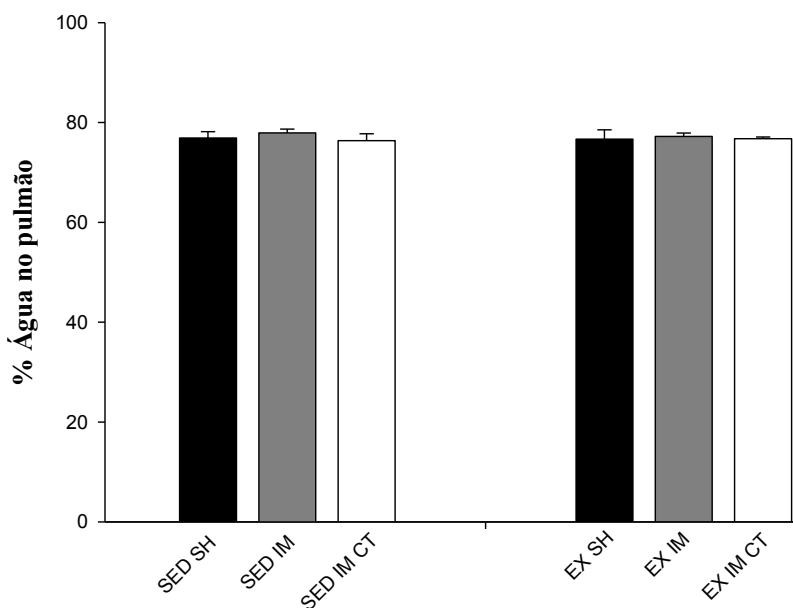


Figura 8: Percentual de água no pulmão. N = 6 por grupo. Dados expressos em média  $\pm$  EPM. SED SH (sedentário sham), SED IM (sedentário infartado), SED IM CT (sedentário infartado tratado células tronco), EX SH (exercitado sham), EX IM (exercitado infartado), EX IM CT (exercitado infartado tratado com células tronco).

#### 4.6- Conteúdo de colágeno

A análise do colágeno intersticial foi feita a partir da técnica de coloração com Picrosirius Red e microscopia de polarização. Nessa técnica, as fibras colágenas se coram em tons de laranja a vermelho, conforme demonstrado pela figura 9 e 10. Os dados relativos à contagem de colágeno no ventrículo esquerdo estão apresentados na tabela 3. O infarto, independente dos fatores exercício e terapia celular, aumentou ( $p < 0,05$ ) o conteúdo de colágeno na região de cicatriz (não infartados =  $0,089 \pm 0,014$   $\%/mm^2$  vs infartados =  $0,564 \pm 0,014$   $\%/mm^2$ ), na borda de transição (não infartados =  $0,081 \pm 0,007$   $\%/mm^2$  vs infartados =  $0,292 \pm 0,007$   $\%/mm^2$ ) e na região remota (não infartados =  $0,046 \pm 0,047$   $\%/mm^2$  vs infartados =  $0,075 \pm 0,004$   $\%/mm^2$ ). A terapia celular reduziu o conteúdo de colágeno na região de cicatriz (tratados =  $0,345 \pm 0,014$

$\%/mm^2$  vs não tratados =  $0,564 \pm 0,014 \%/mm^2$ ), na borda de transição (tratados =  $0,202 \pm 0,007 \%/mm^2$  vs não tratados =  $0,292 \pm 0,007 \%/mm^2$ ) e na área remota (tratados =  $0,054 \pm 0,004 \%/mm^2$  vs não tratados =  $0,075 \pm 0,004 \%/mm^2$ ). Avaliado isoladamente, o fator exercício reduziu ( $p < 0,05$ ) o conteúdo de colágeno na área de transição (treinados =  $0,172 \pm 0,006 \%/mm^2$  vs não treinados =  $0,211 \pm 0,006 \%/mm^2$ ) e na área remota (treinados =  $0,045 \pm 0,003 \%/mm^2$  vs não treinados =  $0,072 \pm 0,003 \%/mm^2$ ). Houve interação entre os fatores na análise da região de cicatriz e na borda de transição e a associação dos tratamentos não potencializou os resultados obtidos pelos tratamentos isolados.

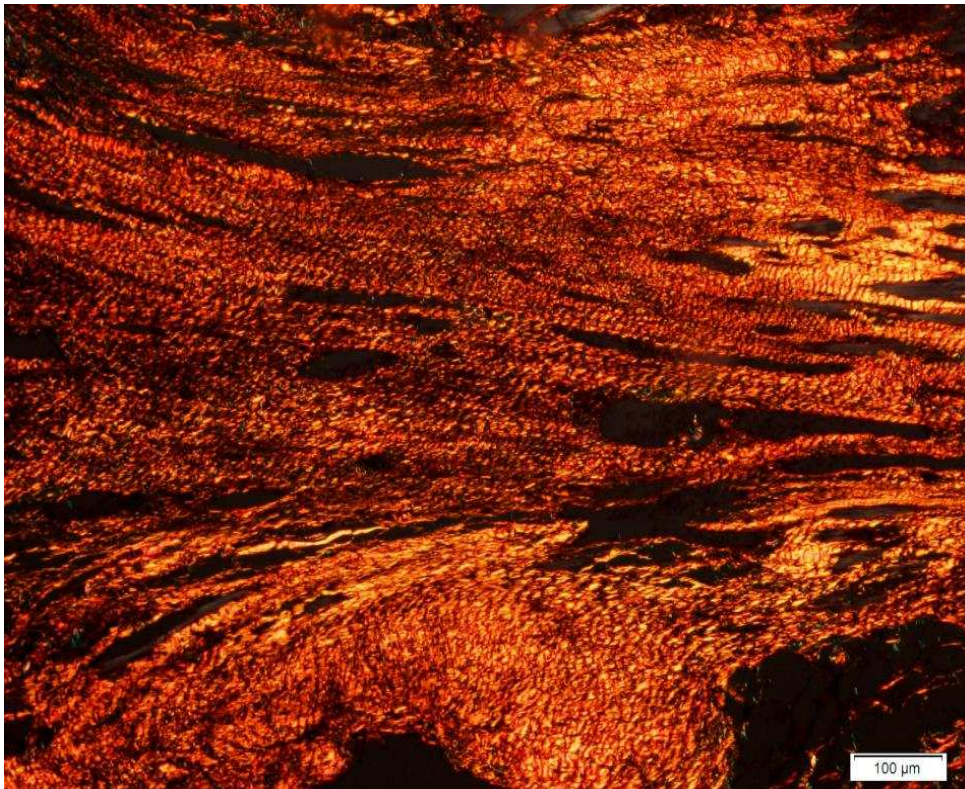


Figura 9: Fotomicrografia representativa da região infartada do ventrículo esquerdo evidenciando a cicatriz de colágeno tipo I. Barra: 100 $\mu$ m.

Tabela 3: Conteúdo de colágeno (%/mm<sup>2</sup>) no ventrículo esquerdo em cada uma das três áreas analisadas (cicatriz, borda de transição e remota).

GRUPOS	CICATRIZ	TRANSIÇÃO	REMOTA
SED SH	0,105 ± 0,008	0,097 ± 0,007	0,065 ± 0,006
SED IM	0,605 ± 0,024*	0,335 ± 0,014*	0,086 ± 0,006
SED IM CT	0,322 ± 0,024*\$	0,201 ± 0,012*\$	0,064 ± 0,005
EX SH	0,073 ± 0,007	0,065 ± 0,005*	0,028 ± 0,004*
EX IM	0,523 ± 0,021#§	0,249 ± 0,013#§	0,065 ± 0,006#§
EX IM CT	0,367 ± 0,024#§	0,203 ± 0,010#§	0,044 ± 0,004¥

Dados expressos em média ± EPM. N = 6 por grupo. SED SH (sedentário sham), SED IM (sedentário infartado), SED IM CT (sedentário infartado tratado células tronco), EX SH (exercitado sham), EX IM (exercitado infartado), EX IM CT (exercitado infartado tratado com células tronco). \* diferente do grupo SED SH; \$ diferente do grupo SED IM; # diferente do grupo EX SH; § diferente do grupo EX IM; ¥ diferente do grupo SED IM CT. Nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

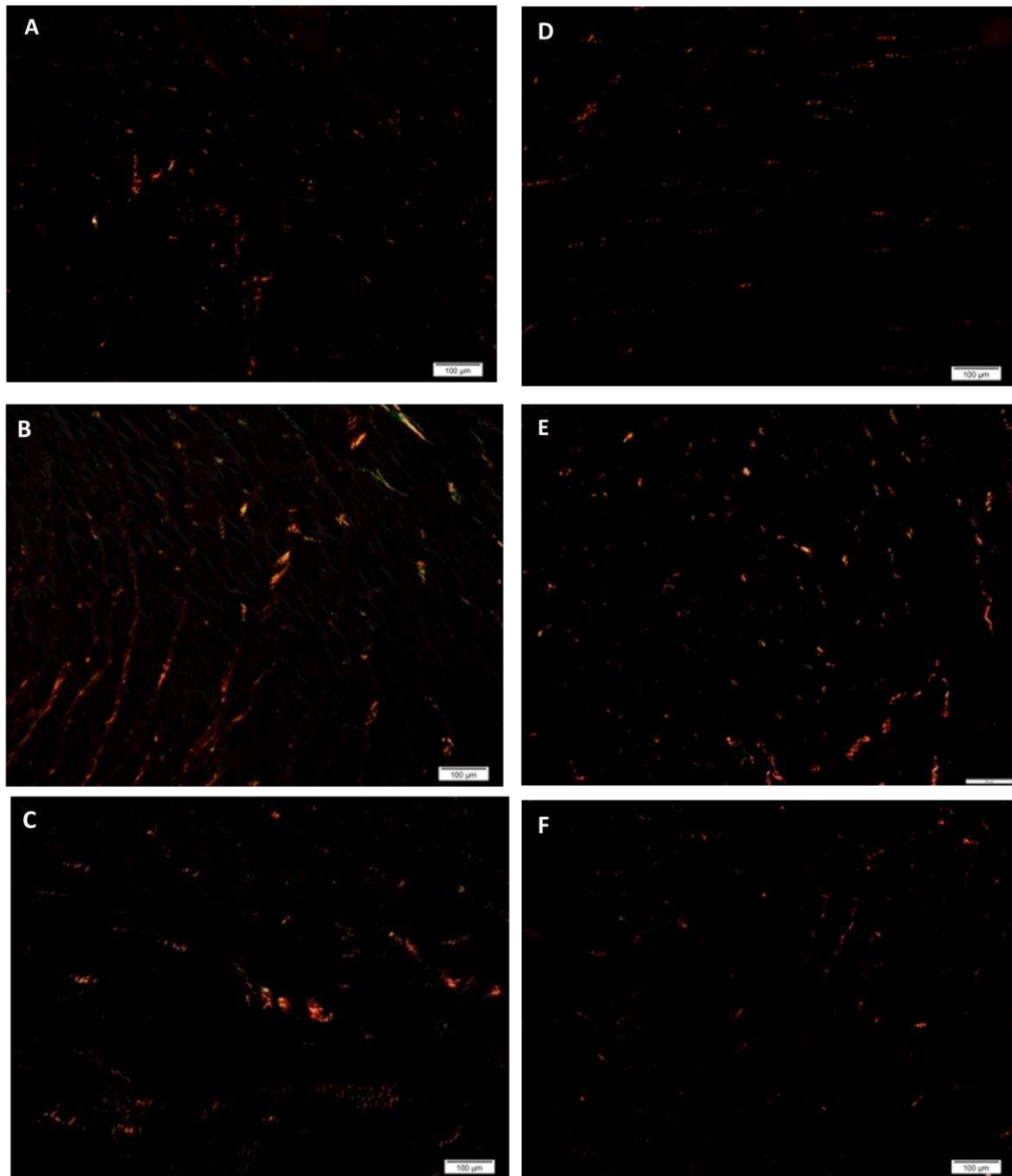


Figura 10: Fotomicrografias representativas da região remota do ventrículo esquerdo coradas com picosirius red sob luz polarizada. O colágeno cora-se em tons de laranja e vermelho. O fundo escuro compreende regiões de músculo cardíaco e tecido intersticial não ocupadas pelo colágeno. Barra: 100µm. (A) SH (sedentário sham), (B) SED IM (sedentário infartado), (C) SED IM CT (sedentário infartado tratado células tronco), (D) EX SH (exercitado sham), (E) EX IM (exercitado infartado), (F) EX IM CT (exercitado infartado tratado com células tronco).

#### 4.7- Contagem de vasos

Os dados referentes à contagem de vasos estão apresentados na tabela 4. Foram obtidos a partir da coloração das membranas basais dos vasos com a técnica do ácido periódico de Schiff (PAS). A análise realizada 12 semanas após o infarto mostrou um

número maior ( $p < 0,05$ ) de vasos por área na região da cicatriz nos animais infartados (não infartados =  $0,043 \pm 0,006 \text{ \%/mm}^2$  vs infartados =  $0,120 \pm 0,006 \text{ \%/mm}^2$ ). Nas outras regiões avaliadas, não houve efeito de nenhum dos fatores sobre esse parâmetro. Não houve interação entre os fatores. A figura 11 é representativa do miocárdio infartado, evidenciando os pequenos vasos (arteríolas, vênulas e capilares). A análise de expressão proteica do VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) analisada na região remota ao infarto também não apresentou diferenças entre os grupos (Figura 12).

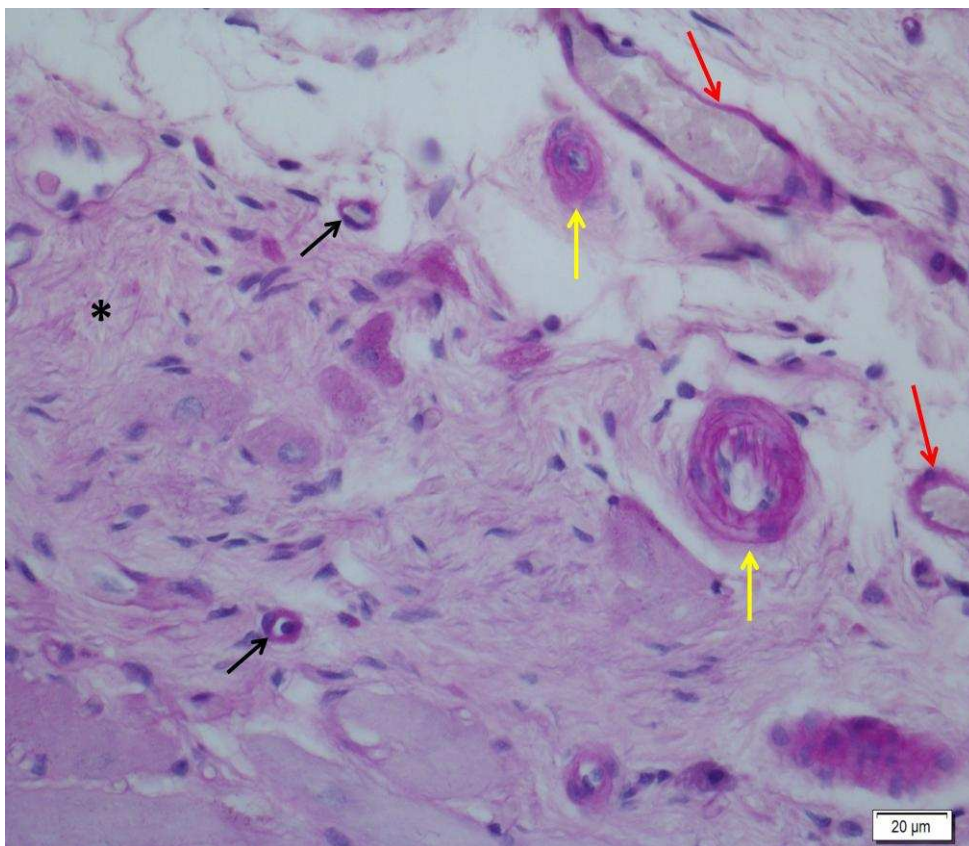


Figura 11: Fotomicrografia representativa da região isquêmica corada com PAS e contracorada com hematoxilina de Harris. O asterisco representa as fibras colágenas, setas pretas indicam capilares; setas vermelhas indicam vênulas e setas amarelas apontam arteríolas. Barra: 20  $\mu\text{m}$ .

Tabela 4: Percentual de vasos por milímetro quadrado (%/mm<sup>2</sup>) no ventrículo esquerdo em cada uma das três áreas analisadas (cicatriz, borda de transição e remota).

GRUPOS	CICATRIZ	TRANSIÇÃO	REMOTA
SED SH	0,038 ± 0,002	0,044 ± 0,008	0,047 ± 0,010
SED IM	0,118 ± 0,035*	0,047 ± 0,002	0,045 ± 0,008
SED IM CT	0,119 ± 0,017*	0,047 ± 0,015	0,041 ± 0,004
EX SH	0,049 ± 0,010	0,050 ± 0,004	0,045 ± 0,006
EX IM	0,122 ± 0,019#	0,039 ± 0,012	0,034 ± 0,027
EX IM CT	0,105 ± 0,035#	0,042 ± 0,002	0,033 ± 0,004

Dados expressos em média ± EPM. N = 6 por grupo. SED SH (sedentário sham), SED IM (sedentário infartado), SED IM CT (sedentário infartado tratado células tronco), EX SH (exercitado sham), EX IM (exercitado infartado), EX IM CT (exercitado infartado tratado com células tronco). \* diferente do grupo SED SHAM; # diferente do grupo EX SHAM. Nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

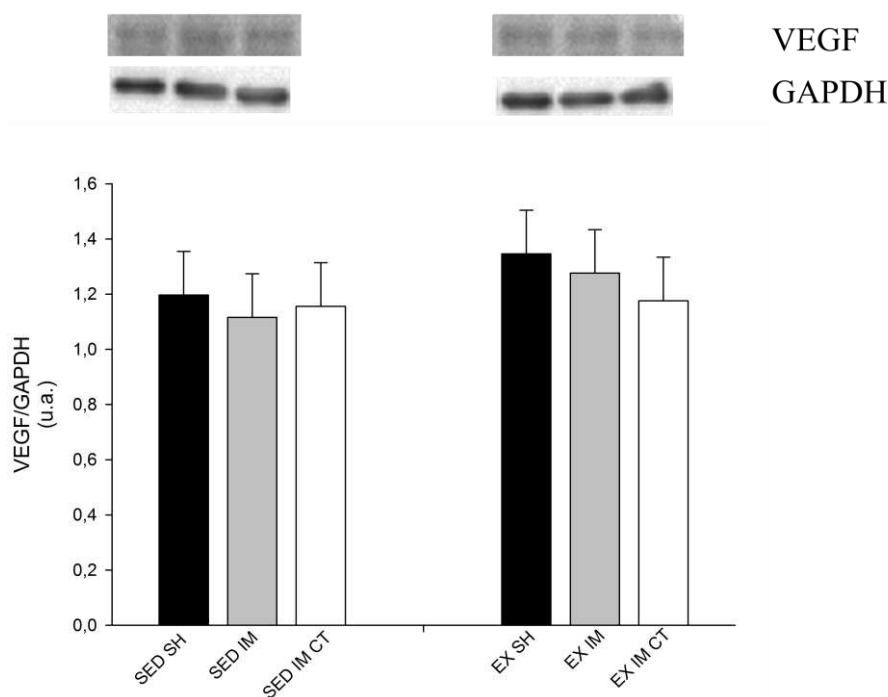


Figura 12: Expressão proteica de VEGF na região remota ao infarto no ventrículo esquerdo. Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), unidades arbitrárias (u.a.). A banda alvo foi normalizada pela expressão de GAPDH. SED SH (sedentário sham), SED IM (sedentário infartado), SED IM CT (sedentário infartado tratado células tronco), EX SH (exercitado sham), EX IM (exercitado infartado), EX IM CT (exercitado infartado tratado com células tronco).

#### 4.8- Características morfológicas dos cardiomiócitos isolados da região remota

Os resultados da morfologia dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo estão apresentados na tabela 5. Não houve diferença entre os grupos em relação à largura celular. No parâmetro comprimento dos cardiomiócitos percebe-se o efeito do fator infarto (não infartados =  $164,68 \pm 2,72$  vs infartados =  $179,34 \pm 2,56$ ), independente dos fatores exercício e terapia celular. A relação comprimento/largura foi maior nos animais infartados, comprovando o efeito do fator infarto nessa variável (não infartados =  $10,14 \pm 0,27$  vs infartados =  $11,37 \pm 0,26$ ), independente dos fatores exercício e terapia celular. Houve efeito também do fator infarto na variável volume celular (não infartados =  $21,42 \pm 0,62$  vs infartados =  $23,39 \pm 0,67$ ), independente dos fatores exercício e terapia celular. Não houve interação entre os fatores.

Tabela 5: Características morfológicas dos cardiomiócitos isolados da região remota do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos experimentais.

GRUPOS	LARGURA ( $\mu\text{m}$ )	COMPRIMENTO ( $\mu\text{m}$ )	RELAÇÃO	
			COMP/LAR (cm)	VOLUME (pL)
SED SH	$17,24 \pm 0,54$	$164,22 \pm 3,84$	$10,00 \pm 0,39$	$21,45 \pm 0,87$
SED IM	$17,40 \pm 0,48$	$180,78 \pm 3,43^*$	$10,94 \pm 0,35$	$23,84 \pm 0,77$
SED IM CT	$18,45 \pm 0,52$	$179,10 \pm 3,75^*$	$10,20 \pm 0,38$	$25,13 \pm 0,85^*$
EX SH	$17,11 \pm 0,54$	$165,15 \pm 3,87$	$10,27 \pm 0,39$	$21,39 \pm 0,87$
EX IM	$17,11 \pm 0,55$	$177,91 \pm 3,81^{\S}$	$11,81 \pm 0,38^{\S}$	$22,94 \pm 1,09$
EX IM CT	$18,39 \pm 0,50$	$175,50 \pm 3,55$	$10,27 \pm 0,36$	$24,35 \pm 0,80^{\S}$

Dados expressos em média  $\pm$  EPM. N = 60 por grupo. SED SH (sedentário sham), SED IM (sedentário infartado), SED IM CT (sedentário infartado tratado células tronco), EX SH (exercitado sham), EX IM (exercitado infartado), EX IM CT (exercitado infartado tratado com células tronco). \* diferente do grupo SED SH;  $\S$  diferente do grupo EX SH. Nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

#### 4.9- Expressão proteica das vias de sinalização de hipertrofia fisiológica e patológica

A expressão das proteínas AKT, pAKT, mTOR, pmTOR, NFAT e calcineurina não apresentou diferença entre os grupos. Os resultados estão demonstrados nas figuras 13 e 14.

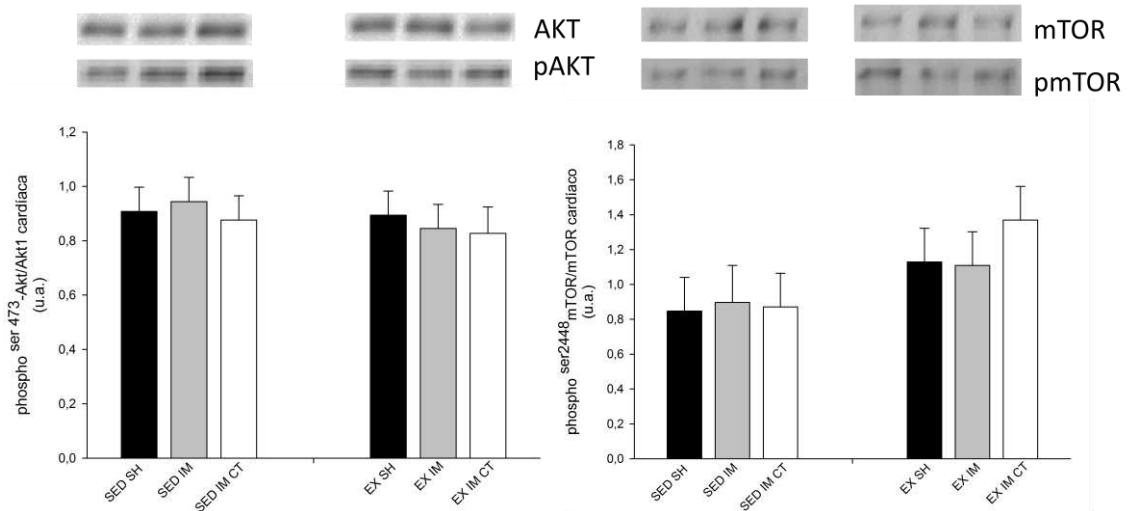


Figura 13: Expressão proteica no ventrículo esquerdo das proteínas da via de sinalização de hipertrofia fisiológica. N = 6 por grupo. AKT total (AKT), AKT fosforilada (pAKT), mTOR total (mTOR), mTOR fosforilada (pmTOR). SED SH (sedentário sham), SED IM (sedentário infartado), SED IM CT (sedentário infartado tratado células tronco), EX SH (exercitado sham), EX IM (exercitado infartado), EX IM CT (exercitado infartado tratado com células tronco).

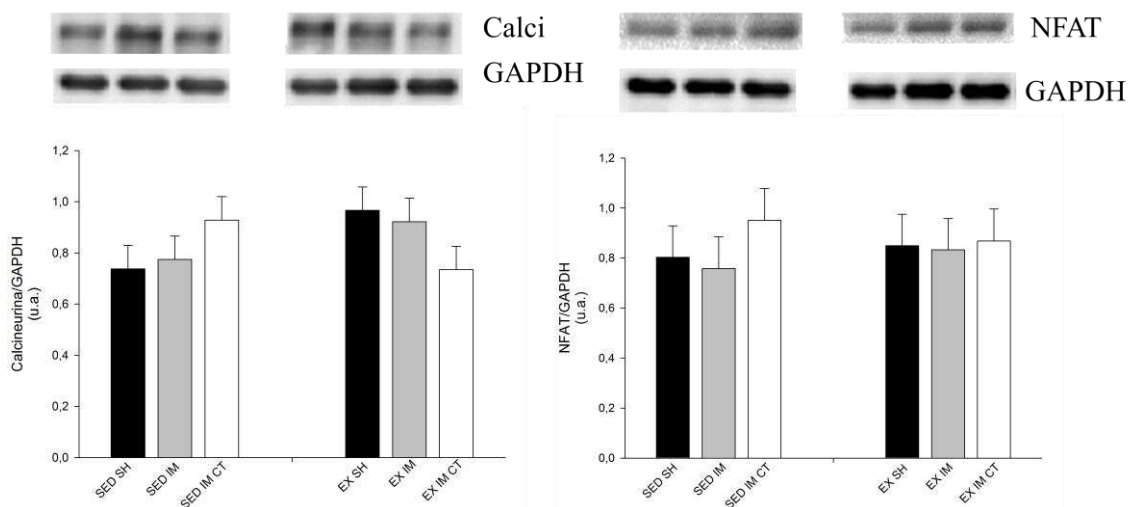


Figura 14: Expressão proteica no ventrículo esquerdo das proteínas da via de sinalização de hipertrofia patológica. N = 6 por grupo. As bandas alvo foram normalizadas pela expressão de GAPDH. Calci (Calcineurina), u.a. (unidades arbitrárias), SED SH (sedentário sham), SED IM (sedentário infartado), SED IM CT (sedentário infartado tratado células tronco), EX SH (exercitado sham), EX IM (exercitado infartado), EX IM CT (exercitado infartado tratado com células tronco).

#### **4.10- Medida de expressão gênica**

Os dados referentes à medida de expressão gênica no tecido miocárdico remoto do ventrículo esquerdo estão apresentados na figura 15. A hipertrofia patológica é associada à reexpressão de genes fetais, como a actina  $\alpha$ -esquelética e fator natriurético atrial (FNA), além de alterações nas expressões gênicas da miosina de cadeia pesada tipo beta ( $\beta$ -MCP) e alfa ( $\alpha$ -MCP). Nossos dados mostraram que nem o infarto nem a terapia celular causaram alterações significativas nesses parâmetros. O fator exercício avaliado isoladamente foi capaz de reduzir ( $p < 0,05$ ) a expressão gênica da actina  $\alpha$ -esquelética (35%), de FNA (53%) e  $\beta$ -MCP (34%), além de aumentar a relação  $\alpha/ \beta$  – MCP (80%).

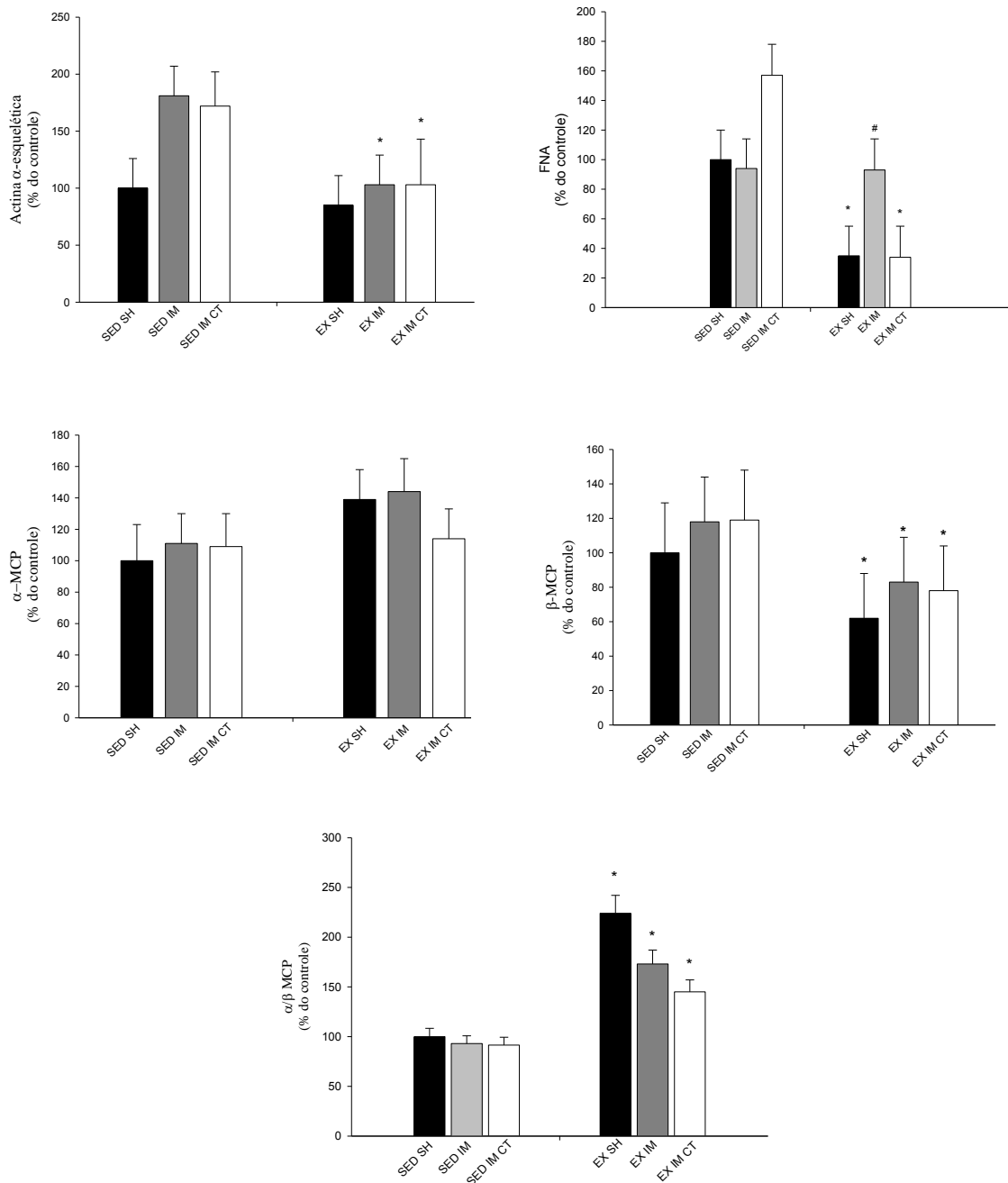


Figura 15: Expressão gênica na região remota do ventrículo esquerdo nos diferentes grupos experimentais. N = 6 por grupo. Dados apresentados como média ± EPM. SED SH (sedentário sham), SED IM (sedentário infartado), SED IM CT (sedentário infartado tratado células tronco), EX SHAM (exercitado sham), EX IM (exercitado infartado), EX IM CT (exercitado infartado tratado com células tronco), FNA (fator natriurético atrial), α-MCP (miosina de cadeia pesada alfa), β-MCP (miosina de cadeia pesada beta). α/β-MCP (relação α-MCP/β-MCP). \* diferente dos respectivos sedentários; # diferente dos grupos EX SH e EX IM CT. Nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

## 5- DISCUSSÃO

Em suma, os resultados do presente trabalho mostraram que o IM promoveu alterações deletérias ao coração, aumentando os seguintes parâmetros: massa cardíaca, índice cardiossomático, diâmetro do ventrículo esquerdo, espessura da parede do ventrículo esquerdo, comprimento, relação comprimento/largura e volume dos cardiomiócitos, fibrose intersticial na região de cicatriz, na borda de transição e na área remota do ventrículo esquerdo, além de prejudicar parâmetros funcionais como fração de ejeção e fração de encurtamento. O protocolo de exercício aeróbio de baixa intensidade em esteira melhorou a capacidade física dos animais, induziu a bradicardia de repouso, aumentou a fração de ejeção e fração de encurtamento, reduziu o tamanho do infarto e a fibrose intersticial no ventrículo esquerdo, além de reduzir a expressão de genes marcadores de hipertrofia cardíaca patológica (actina  $\alpha$ -esquelética, fator natriurético atrial e actina de cadeia pesada  $\beta$ ) e aumentou a relação de  $\alpha/\beta$ -MCP. A terapia celular, por sua vez, reduziu o tamanho do infarto e a fibrose intersticial e melhorou os parâmetros de fração de ejeção e encurtamento nos animais sedentários. A associação dos tratamentos, de forma inesperada, não apresentou sinergia e não resultou em alterações benéficas adicionais aos parâmetros avaliados.

Entender as razões pelas quais os tratamentos treinamento físico e transplante celular, isoladamente, exercem alterações benéficas no miocárdio infartado, mas não ao serem associados, torna-se objeto de estudo para trabalhos futuros. No presente estudo, a hipótese de que o treinamento aeróbio de baixa intensidade por 12 semanas iniciado 24 horas após o IM, associado ao transplante de CTM injetado pela veia caudal imediatamente após evento isquêmico poderia atenuar os efeitos deletérios decorridos pelo IM foi negada. Para confirmar que a associação dos tratamentos potencializou seus efeitos no IM, o grupo exercitado que recebeu a infusão de CTM (EX IM CT) deveria ter resultados significativamente superiores aos observados nos grupos EX IM e SED IM CT, concomitantemente. Apesar disso, não se pode negar as adaptações benéficas dos tratamentos isolados que contribuíram para a melhora da função cardíaca e da saúde cardiovascular geral dos animais tratados.

Nossos resultados demonstram que a técnica utilizada para indução do IM produziu infartos de tamanhos pequenos. Segundo Pfeffer et al. (1979) o percentual de acometimento do VE de 4 a 30% é considerado pequeno, o que está em concordância com outros autores (Fletcher et al., 1981; Anversa et al., 1986). De forma similar, os

animais do presente estudo não apresentaram aumento do conteúdo de água pulmonar. O edema pulmonar ou acúmulo de água no pulmão é uma característica secundária do infarto e é um indicador de falha da bomba cardíaca em ejetar quantidades adequadas de sangue. Dessa forma o sangue se acumula nos vasos pulmonares e ocorre extravasamento de água devido à pressão pulmonar aumentada (Figuroa et al., 2006). Foi demonstrado que pequenos infartos podem não causar insuficiência cardíaca congestiva (Portes & Tucci, 2006) e que infartos com percentual de acometimento maior que 40% do VE são geralmente acompanhados por esta patologia. (Tucci, 2011).

O desempenho da função ventricular, bem como a extensão da hipertrofia no miocárdio remanescente não infartado, tem relação direta com a extensão da perda de tecido miocárdico (Pfeffer et al., 1979; Fletcher et al., 1981). Os dados do presente estudo mostraram que o infarto causou alterações deletérias na fração de ejeção e fração de encurtamento. Os presentes resultados estão de acordo com outros trabalhos que mostraram prejuízos na funcionalidade cardíaca, além da redução da fração de ejeção e encurtamento, outras consequências hemodinâmicas deletérias são achados constantes neste modelo, como hipotensão arterial média, redução da pressão sistólica,  $dP/dt_{máx}$  e  $dP/dt_{mín}$ , bem como elevação da pressão diastólica final (Pfeffer et al., 1979; Fletcher et al., 1981; Pfeffer et al., 1990; de Waard et al., 2007; Xu et al., 2008; Jorge et al., 2011).

Os parâmetros massa cardíaca, índice cardiossomático, diâmetro da câmara ventricular, espessura da parede do ventrículo esquerdo e conteúdo de colágeno estavam aumentados nos animais dos grupos infartados, o que constitui características típicas da hipertrofia patológica que ocorre durante o remodelamento do órgão (Pfeffer et al., 1990; French & Kramer, 2008; Zornoff et al., 2009; Xu et al., 2008; Mill et al., 2011; Jugdutt et al., 2012). A dilatação ventricular após o infarto pode ser vista como uma compensação inicial para manter o volume de ejeção após a perda de tecido contrátil, no entanto, essa dilatação pode aumentar o estresse na parede ventricular, estimulando a hipertrofia dos miócitos remanescentes, que ainda assim pode ser insuficiente para manter a fração de ejeção e de encurtamento (Pfeffer et al., 1990; Gajarsa & Kloner, 2009).

Em nível celular, análises morfométricas do presente estudo mostraram que o infarto não teve nenhum efeito sobre a largura dos cardiomiócitos. Esses dados estão de acordo com outros trabalhos desenvolvidos em ratos infartados (Zhang et al, 2000; Bozi et al, 2013). Já os parâmetros comprimento celular, relação comprimento/largura e volume celular foram aumentados pelo infarto. Essa alteração acontece em decorrência

do rearranjo estrutural dos cardiomiócitos remanescentes e outras células cardíacas como parte do processo de remodelamento, numa tentativa das porções viáveis do coração infartado compensar o estresse sobre a parede ventricular e assumir o trabalho contrátil dos cardiomiócitos perdidos por necrose e apoptose (Mill et al., 2011; Gajarsa & Kloner, 2009). O aumento do comprimento celular se deve à maior síntese proteica e formação de novos sarcômeros em série, refletindo no aumento do volume celular, conforme observado nos grupos SED IM CT e EX IM CT. Os animais dos grupos SED IM e EX IM não apresentaram aumento de volume celular, porém aumentaram a massa cardíaca e índice cardioossomático, respectivamente. Especula-se que o aumento da espessura da parede ventricular nesses animais, comprovado pelo exame ecocardiográfico, tenha sido pela fibrose miocárdica exacerbada em decorrência do infarto, confirmada pela análise de conteúdo de colágeno.

Não foi possível a detecção de alterações na expressão de calcineurina e NFAT, proteínas da via de sinalização de hipertrofia patológica, apesar da hipertrofia excêntrica observada nos cardiomiócitos da região remota do ventrículo esquerdo nos animais infartados. Pelo fato da análise proteica ter sido feita no tecido cardíaco fragmentado e não no cardiomiócito isolado, os resultados podem ter sido influenciados pela expressão das proteínas de outras células cardíacas. Além disso, a expressão dessas proteínas mostrou-se aumentada após oito semanas de hipertrofia patológica induzida por sobrecarga de pressão ou infarto do miocárdio (Wilkins et al., 2004), o que difere do período de doze semanas do presente trabalho.

De forma similar, a expressão dos genes característicos do período fetal também não foi alterada de forma significativa no presente estudo. Sabe-se que a hipertrofia patológica pós-infarto é caracterizada por um padrão de reexpressão desses genes que contribuem para uma diminuição da capacidade contrátil e velocidade de encurtamento dos sarcômeros (Bernardo et al., 2010; Hashimoto et al., 2011; Mill et al., 2011). O fator de transcrição NFAT é conhecido por regular a transcrição e expressão de genes cardíacos, dentre eles os genes fetais (Dirkx et al., 2013). Como a atividade de calcineurina e NFAT não foi alterada no presente estudo, a não translocação de NFAT para o núcleo pode justificar a ausência de alterações na reexpressão do programa fetal.

A análise da quantidade de vasos no tecido cardíaco revelou que, 12 semanas após o infarto, a região da cicatriz apresentava um percentual maior de vasos sanguíneos em comparação com os animais SHAM. Mitoses de células endoteliais e proliferação de pequenos vasos sanguíneos são aparentes 48 horas após o evento isquêmico e se

mantêm em níveis elevados no tecido totalmente cicatrizado (Fishbein et al., 1978). O conceito de que o coração adulto é essencialmente incapaz de se regenerar vem sendo mudado para uma modesta capacidade de potencial regenerativo, graças à descoberta do compartimento de células-tronco endógeno cardíacas, células que possuem a capacidade de formar cardiomiócitos, células do endotélio vascular e células musculares lisas (Urbanek et al., 2005; Ellison et al., 2012; Anversa et al., 2013). No entanto, apesar de alguns afirmarem que as células endógenas são suficientes para a regeneração funcional e reparo do miocárdio (Ellison et al., 2013; Nadal-Ginard et al., 2014), no estudo de van Berlo et al, (2014) foi mostrado que esse compartimento gera células endoteliais amplamente, enquanto a formação de cardiomiócitos se dá numa taxa de apenas 0,03%, considerado pelos autores um nível funcionalmente insignificante. Dessa forma, o aumento de vasos sanguíneos na região de cicatriz encontrado no presente estudo pode indicar que houve uma revascularização da região necrosada como tentativa de atenuar os danos em decorrência do infarto.

Estratégias envolvendo a terapia celular para promover a regeneração cardíaca mostram resultados promissores no tratamento após IM. Diversos tipos celulares e metodologias de inoculação das células têm sido utilizados (Shah & Shalia, 2011; Russo et al., 2014; Narita & Suzuki, 2014). A linhagem celular utilizada no presente estudo foi de células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea de ratos e o transplante através de injeção intravenosa via veia caudal. As células isoladas e cultivadas nesse estudo apresentaram aderência à placa de cultura e morfologia fibroblastóide, bem como tiveram expressão positiva para os marcadores CD54 e CD90 e expressão negativa para CD34 e CD45.

A nanomarcagem com Q-tracker na cultura de CTM se mostrou eficaz e foi comprovada por microscopia de fluorescência imediatamente antes de serem injetadas nos animais. No período de 18 horas pós-infarto, essas células injetadas na veia caudal não foram encontradas no local da lesão, apenas no pulmão dos animais infartados. A inoculação de CTM via veia caudal é bastante empregada pela facilidade de ser reproduzida em ensaios clínicos, pela ampla biodistribuição e pelo fácil acesso (Schrepfer et al., 2007; Fischer et al., 2009; Narita & Suzuki, 2014), porém ainda existem dúvidas em relação à sua eficiência. Esse nosso achado pode ser explicado pelo estudo de Schrepfer et al., (2007) no qual afirmam que as CTM são aprisionadas nos capilares pulmonares devido ao seu grande diâmetro. Outros estudos, entretanto mostraram que o acúmulo das CTM no pulmão é um fenômeno transitório e que as

células se movem para outros órgãos poucas horas após a injeção intravenosa (Gao et al., 2001). O fato de nosso estudo ter encontrado as CTM no pulmão 18 horas após a injeção não necessariamente significa que elas não tenham migrado para o órgão alvo em algum momento posterior do período experimental. Kraitchman et al. (2005) observaram in vivo que a captação inicial das CTM marcadas com isótopo radioativo administradas 72 horas após o infarto foram primariamente restritas aos pulmões, no entanto, 24 horas após a injeção, já eram vistas no miocárdio infartado onde persistiam por até sete dias.

Outra explicação para a retenção dessas células no pulmão diz respeito à capacidade de adesão das CTM no endotélio vascular pulmonar. Parece haver uma interação das CTM com receptores P-selectina e VCAM-1 das células endoteliais (Ruster et al., 2006). Esse conceito é reforçado pelo estudo de Fischer et al., (2009) que mostrou maiores quantidades de CTM em outros órgãos após a administração de uma segunda dose terapêutica, sugerindo uma saturação prévia dos receptores que permitiram a maior liberação das CTM para além do tecido pulmonar.

A terapia celular, no presente estudo, provocou aumento na fração de ejeção e fração de encurtamento, conforme observado nos animais do grupo SED IM CT em comparação aos do grupo SED IM, no entanto, não apresentou efeito adicional associado ao exercício. Diversos estudos correlacionam a melhora da função cardíaca com terapias que utilizam CTM (Shake et al., 2002; Nagaya et al., 2004; Mills et al., 2007; Timmers et al., 2008; Wang et al., 2012; Narita & Suzuki, 2014). É provável que melhoras na propagação do impulso e da condutibilidade elétrica tenham ocorrido em função de uma melhor preservação dos cardiomiócitos da região limítrofe ao infarto conforme observado por Mills e colaboradores (2007). Foi demonstrado que as CTM podem induzir melhoras no acoplamento excitação-contração por meio de mudanças no transiente de  $Ca^{2+}$  e atividade da SERCA 2, promovendo melhor função contrátil, fração de encurtamento e prevenção de arritmias (DeSantiago et al., 2012; Lavorato, 2014).

A terapia celular reduziu o tamanho do infarto e o conteúdo de colágeno nas regiões: cicatriz, borda de transição e remota. Esses achados estão de acordo com outros estudos experimentais que também mostraram efeitos benéficos das células-tronco nessas variáveis (Shake et al., 2002; Timmers et al., 2008; Lee et al., 2009). Descreve-se que essa terapia pode agir de forma a incrementar a angiogênese, efeito não observado no presente estudo, e amenizar o remodelamento da matriz extracelular, o que poderia impedir a dilatação ventricular, diminuir a morte celular por apoptose e

necrose e liberar fatores de crescimento e citocinas que induzem o processo de cicatrização e a sobrevivência dos miócitos (Gnecchi et al., 2008; Shah & Shalia, 2011; Ni et al., 2014). Um novo mecanismo de ação das CTM que tem sido proposto é sua influência sobre células progenitoras cardíacas. Sugere-se que as CTM ajam sobre esse tipo celular, estimulando-o a se diferenciar em cardiomiócitos e restaurar a função cardíaca através da cardiomiogênese (Nagaya et al., 2004; Hatzistergos et al., 2010).

Os tratamentos associados reduziram o conteúdo de colágeno, confirmados pelos menores resultados do grupo EX IM CT, quando comparados aos do grupo EX IM, no entanto, para garantir a potencialização da associação dos tratamentos, este resultado deveria ser menor também em relação ao grupo SED IM CT.

Existem evidências de que os fatores parácrinos liberados pelas CTM podem agir sobre a matriz extracelular, favorecendo o remodelamento pós-infarto (Gnecchi et al., 2008). Sugere-se que os mecanismos responsáveis por redução do conteúdo de colágeno estejam relacionados à redução na expressão de metaloproteinase da matriz (MMP) (Nagaya et al., 2004; Souza et al., 2010) e atenuação da expressão de colágeno do tipo I e III pela inibição da proliferação de fibroblastos cardíacos, portanto, exercendo efeitos anti-fibróticos (Xu et al., 2008; Ohnishi et al., 2007).

O estudo de Lee et al., (2009) mostrou que a infusão intravenosa de CTM em camundongos infartados resultou em aprisionamento dessas células como êmbolo no pulmão. A terapia celular mostrou redução da resposta inflamatória no miocárdio e no tamanho do infarto, além de melhora da função cardíaca. Os autores mostraram que essa melhora funcional se deve, pelo menos em parte, ao aumento da expressão de múltiplos genes pelas CTM retidas no pulmão, com notável importância da proteína anti-inflamatória TSG-6. A proteína TSG-6 produz três distintos efeitos anti-inflamatórios: inibe a infiltração de neutrófilos para os locais da inflamação; liga-se a fragmentos de hialurona bloqueando seu efeito pró-inflamatório e diminui a rede inflamatória primariamente pelo aumento da atividade de inibidores de proteases (Milner et al., 2006; Wisniewski & Vilcek, 2004).

Sabe-se que uma resposta inflamatória excessiva contribui para alterações patológicas produzidas pelo IM, dessa forma, a expressão de TSG-6 recebe especial atenção pelo seu efeito anti-inflamatório (Lee et al., 2009). Os resultados não excluem a possibilidade de que as CTM presas na vasculatura pulmonar secretem fatores cardioprotetores adicionais. Estudos *in vitro* mostraram que a infusão de CTM em cultura secretaram grandes quantidades de fatores, como TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10, PGE-2

(Gnecchi et al., 2008; Caplan, 2009; Ohtaki et al., 2008). Assim, os presentes achados sugerem que, mesmo as CTM transplantadas pela veia caudal e observadas apenas no pulmão, podem ter tido uma ação imunomodulatória criando um ambiente que permitiu a redução do tamanho do infarto e menor conteúdo de colágeno nos animais sedentários que receberam as CTM (SED IM CTM) em comparação ao grupo não tratado (SED IM). É provável que a diminuição da fibrose contribua para a restauração do miocárdio, tornando-o mais funcional, como se conclui pela observação de melhores índices da fração de ejeção e da fração de encurtamento dos animais do grupo SED IM CTM em comparação aos do grupo SED IM.

Após o IM, uma reação inflamatória local é responsável por “limpar” o miocárdio danificado. A intensidade e duração dessa inflamação estão intimamente correlacionadas ao remodelamento da área afetada e ao grau da disfunção cardíaca (Frangogiannis et al., 2014; Van der Akker et al., 2013). Estudos demonstram que a terapia com CTM vai além do propósito de serem meras produtoras e substituidoras celulares. Essas células são capazes de secretar vários fatores que inibem a resposta imune mediada por linfócitos, que atuando sobre outras células, contribuem para redução da inflamação estabelecida pelo IM (Di Nicola et al., 2002; Yi & Song, 2012; Van der Akker et al., 2013). Além disso, o transplante realizado de forma precoce após evento isquêmico atua fornecendo suporte trófico através da grande quantidade de fatores bioativos secretados. A atividade trófica inibe a apoptose causada pela isquemia e a cicatrização estimulando a angiogênese e a mitose de células progenitoras específicas do tecido (Caplan, 2009).

Postula-se que cada tipo de célula-tronco possui características peculiares e que se utiliza de mecanismos característicos de interação com o ambiente de lesão. Dessa forma, os mecanismos de reparação podem ser variáveis e a terapia combinada pode ser conveniente no tratamento de grandes lesões (Chicha et al., 2013). A combinação de duas terapias coadjuvantes: exercício físico e transplante celular no tratamento do IM não resultaram em alterações significativas superiores aos tratamentos isolados no presente estudo.

A insuficiência cardíaca crônica em decorrência do IM está altamente relacionada com intolerância ao esforço físico, sintoma esse que reflete diretamente sobre a capacidade dos pacientes de realizar atividades da vida diária, prejudicando de forma significativa a qualidade de vida (Adsett & Mullins, 2010). No presente estudo, o treinamento aeróbio de baixa intensidade iniciado 24 horas após o IM aumentou a

capacidade de tolerância ao exercício nos animais infartados. Até o final da década de 80, o exercício era considerado não seguro para pacientes com insuficiência cardíaca e a recomendação era de repouso. Hoje ele é apontado como componente essencial do tratamento não farmacológico em pacientes com insuficiência cardíaca pós IM (Lloyd-Williams et al., 2002; Van Tol et al., 2006; Adsett & Mullins, 2010; Moholdt et al., 2012). Em nosso estudo não houve correlação entre treinamento físico iniciado 24 horas pós-infarto e mortalidade (dados não mostrados).

Outro parâmetro utilizado para avaliar o efeito do treinamento foi a frequência cardíaca de repouso. A bradicardia de repouso é classicamente utilizada para comprovar a adaptação ao treinamento físico. A bradicardia resulta da melhora da capacidade contrátil, do volume de ejeção e da modulação autonômica do coração (Shephard & Balady, 1999). Os dados obtidos no presente estudo estão de acordo com outros trabalhos que demonstram os benefícios do treinamento em esteira de baixa a moderada intensidade em animais infartados (Xu et al., 2008; Jorge et al., 2011; Campos et al., 2012). A menor frequência cardíaca de repouso está associada com a redução de eventos cardiovasculares e aumento na expectativa de vida (Jouven et al., 2005), portanto a redução da FCR nos grupos exercitados demonstra que a aptidão aeróbia obtida através do treinamento em esteira melhorou parâmetros fisiológicos essenciais para a saúde cardiovascular desses animais.

Análises dos dados obtidos pela ecocardiografia dos animais treinados após o infarto indicaram uma melhora da função cardíaca, pois as frações de ejeção e de encurtamento se mostraram com índices superiores em comparação aos animais não treinados. Esses resultados demonstram que, apesar do infarto, os animais treinados tiveram uma contração mais adequada para bombear maiores quantidades de sangue a cada ciclo de batimento. Os mecanismos pelos quais o exercício melhora a função cardíaca passam principalmente por melhoras na contratilidade dos cardiomiócitos, resultante da melhora na função do retículo sarcoplasmático na homeostase do  $Ca^{2+}$  (Zang et al., 2000; Wisloff et al., 2002; Bito et al., 2010).

Nossos resultados mostraram que o exercício reduziu a expansão da área infartada ao comparar o grupo EX IM em relação ao SED IM. Apesar de não serem totalmente esclarecidos os mecanismos responsáveis pelo controle do tamanho do infarto após o exercício físico, existem descritos na literatura diversos possíveis efeitos cardioprotetores do mesmo. Por exemplo: aumento da tolerância à isquemia, que parece ser mediado pela ativação da proteína quinase C (PKC), a qual é aumentada em resposta

ao exercício, garantindo um fenótipo de tolerância à isquemia e protegendo o coração infartado (Yamashita et al., 2001); ativação e diferenciação de células-tronco endógenas cardíacas, gerando novas células no miocárdio (Ellison et al., 2012; Waring et al., 2012); melhora da densidade capilar através da expressão aumentada do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) bem como de seus receptores Flt-1 e Flk-1 resultando em melhora na perfusão miocárdica (Wu et al., 2009).

Os resultados de estudos com exercício físico iniciado horas após o infarto são controversos. No que se refere à cicatriz do infarto, alguns autores encontraram efeitos deletérios (Hammerman et al., 1983; Pfeffer et al., 1990), outros, nenhum efeito (Hockman et al., 1986; de Waard et al., 2007), enquanto outros descreveram redução da cicatriz (Yamashita et al., 2001; Wu et al., 2009; Jorge et al., 2011). O presente trabalho mostrou que o exercício iniciado 24 horas após o infarto agiu positivamente na cicatriz do coração infartado, tendo em vista que o porcentual de acometimento do ventrículo esquerdo foi menor nos animais infartados exercitados do que nos infartados treinados, reforçando as evidências de que o exercício físico pode atenuar a fibrose cardíaca. Houve interação entre os fatores e o efeito da associação não foi simplesmente aditivo.

A redução da fibrose cardíaca em decorrência do exercício foi confirmada pela análise de colágeno na matriz extracelular do ventrículo esquerdo de regiões remotas ao infarto. Esses achados estão de acordo com outros trabalhos que demonstraram menor conteúdo de colágeno nas regiões remotas ao infarto após o exercício (de Waard et al., 2007; Xu et al., 2008). O exercício pós-infarto atenua a ação dos inibidores teciduais de metaloproteinase da matriz, as quais regulam a atividade de metaloproteinases de matriz, dessa forma pode ter ocorrido uma atividade proteolítica aumentada com maior degradação de colágeno nos animais exercitados. Além disso, a redução da expressão de receptores de angiotensina II tipo 1 e do mRNA da enzima conversora de angiotensina em resposta ao exercício podem contribuir também com a redução da fibrose (Xu et al., 2008). Na análise da variável colágeno, não se pode falar em efeito da associação dos tratamentos, pois o grupo EX IM CT não mostrou diferença significativa concomitante entre os grupos EX IM e SED IM CT.

A reprogramação de genes fetais não é aumentada em resposta ao exercício em modelos de hipertrofia fisiológica, ela mostra um perfil de expressão desses genes diferente da patológica (Bernardo et al., 2010; Mill et al., 2011). O treinamento crônico ativa uma via de sinalização celular diferente resultando em uma morfologia cardíaca

normal (Bernardo et al., 2010; Elisson et al., 2012). Porém em modelos experimentais, o exercício atenua a expressão da  $\beta$ -MCP, FNA e actina  $\alpha$ -esquelética no coração de ratos normais (Hashimoto et al., 2011) e infartados (Orenstein et al., 1995; de Waard et al., 2009) e aumenta a expressão de  $\alpha$ -MCP nos animais exercitados, mas não nos infartados (Jin et al., 2000). Nossos resultados mostraram que o treinamento reduziu a expressão dos genes  $\beta$ -MCP, FNA e actina  $\alpha$ -esquelética no VE dos animais infartados. Sabe-se que a isoforma  $\beta$  da MCP tem atividade ATPásica cinco vezes menor do que a isoforma  $\alpha$ , o que provoca diminuição da velocidade de contração e relaxamento e utilização deficiente de energia (Orenstein et al., 1995). A redução da  $\beta$ -MCP, bem como o aumento da relação  $\alpha/\beta$ -MCP nos animais exercitados encontrados no nosso estudo, reforçam a ideia de que o treinamento aeróbio foi capaz de promover adaptações moleculares que pode ser responsáveis, pelo menos em parte, pela melhora da capacidade contrátil e conseqüentemente melhor condição aeróbia e função cardíaca após o IM. Os tratamentos associados foram melhores do que o exercício sozinho na análise do gene FNA (EX IM CT em comparação ao EX IM), no entanto, não se pode falar de potencialização da associação, pois não diferiu do grupo SED IM CT.

De forma inesperada, o protocolo de treinamento adotado nesse estudo não alterou as características morfológicas dos cardiomiócitos nem o padrão de expressão das proteínas da via de sinalização de hipertrofia fisiológica, AKT e mTOR. Estudos demonstram que o grau de hipertrofia fisiológica está relacionado com a intensidade, volume e duração do esforço do programa de treinamento físico, e, além disso, se relaciona diretamente ao nível de aptidão física ou  $VO_{2máx}$  (Blomqvist & Saltin, 1983; Milliken et al., 1988). Em animais experimentais, o treinamento físico com natação induz a hipertrofia excêntrica, enquanto que o treinamento em esteira não provoca hipertrofia cardíaca, ou quando ocorre ela se dá em pequena magnitude (Oliveira & Krieger, 2002).

Hashimoto et al., (2011) investigaram a hipertrofia cardíaca induzida por diferentes volumes de treinamento físico. O protocolo utilizado por estes autores correspondia a 1 sessão diária de natação para um grupo de ratos e um segundo com 3 sessões diárias ao final do período experimental. Foi demonstrado que os treinamentos promoveram bradicardia de repouso, hipertrofia cardíaca, aumento da tolerância ao exercício e do consumo de oxigênio, sendo essas adaptações exacerbadas no grupo 2. O aumento da atividade da proteína quinase-B (Akt) ocorreu de forma dependente ao volume de treinamento físico. O grupo 1 não alterou a expressão gênica de  $\alpha$ -MCP,  $\beta$ -

MCP, relação  $\alpha/\beta$ -MCP, FNA e actina  $\alpha$ -esquelética, no entanto, houve melhora desse perfil genético no grupo 2. Tal estudo indica que a magnitude das adaptações moleculares que levarão à hipertrofia cardíaca é dependente do volume de treinamento físico aplicado.

O conceito de que o treinamento físico fornece meios eficazes para melhorar a aptidão cardiovascular e o estado de saúde de pacientes com insuficiência cardíaca já é um consenso na literatura, no entanto, a intensidade e o momento ideal de exercício que produzirá o máximo de adaptações benéficas são controversos. Estudos têm apontado que o treinamento intervalado de alta intensidade pode ser vantajoso se comparado ao treinamento contínuo moderado em pacientes com insuficiência cardíaca e doenças coronarianas (Rognmo et al., 2004; Warburton et al., 2005; Wisloff et al., 2007; Nilsson et al., 2008; Smart et al., 2013; Moholdt et al., 2012) e os maiores benefícios no remodelamento cardíaco ocorrem com intervenção do treinamento na fase aguda após o IM (Haykowsky et al., 2011; Zhang et al., 2015). Portanto, mais estudos envolvendo diferentes variáveis de treinamento são necessários para fornecer evidências que efetivamente suportem a aplicação de estratégias terapêuticas baseadas no exercício físico.

Cosmo e colaboradores (2012) observaram a sinergia na associação de exercício e transplante celular. Os resultados mostraram incremento na função cardíaca pelo aumento da fração de ejeção e atenuação do remodelamento cardíaco pela redução do conteúdo de colágeno. Esses achados foram explicados pela ação parácrina das células-tronco, sugerindo liberação de fatores que contribuiriam para a angiogênese, além de melhoras no mecanismo de vasodilatação como resultado do treinamento físico. No entanto, é importante notar que o tipo celular empregado, via de inoculação, tipo de exercício e início do treinamento pós-infarto foram diferentes dos empregados no presente estudo.

Em trabalho prévio do nosso laboratório (dados ainda não publicados) avaliou-se a associação da terapia celular com o treinamento físico nas propriedades mecânicas de cardiomiócitos isolados do VE de ratos infartados. Foram utilizados os mesmos protocolos de treinamento, de inoculação e tipo celular. Os dados demonstram diminuição no tempo para o pico de contração e aumento na amplitude do transiente de  $Ca^{2+}$  em resposta aos tratamentos em conjunto, quando comparados aos cardiomiócitos dos animais infartados tratados apenas com CTM. Verificou-se também, aumento da expressão de  $FLB_{ser16}$ , que pode ter sido causado pela ativação de cascatas que modulam

a fosforilação/desfosforilação dessa proteína. De forma similar aos resultados do presente trabalho, o autor demonstrou que os tratamentos podem, isoladamente, produzir adaptações celulares e funcionais no coração acometido pelo IM, contribuindo para a melhora da saúde cardiovascular, e que a associação dos tratamentos resulta em pequenos efeitos sinérgicos entre eles (Lavorato, 2014).

Utilizando a mesma metodologia para avaliar função e morfologia do ventrículo direito (VD) e análise das propriedades mecânicas dos cardiomiócitos isolados do VD, outro estudo do nosso grupo de pesquisa (dados ainda não publicados) demonstrou um único parâmetro alterado pela associação dos tratamentos. Os resultados indicaram redução da amplitude de contração celular, um achado que pode ser explicado por uma melhora da sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{2+}$ , contribuindo em pequeno grau para melhora da força contrátil do VD. Da mesma forma que no presente estudo, concluiu-se que a associação das terapias treinamento físico e transplante celular não exerce efeitos significativos sobre os parâmetros: tamanho do infarto, função de VD, contratilidade e transiente de  $Ca^{2+}$  em miócitos do VD. No entanto, de forma isolada, as terapias causaram adaptações benéficas que resultaram numa melhor função ventricular direita (Belfort, 2014).

Portanto, é plausível considerar que outras metodologias sejam testadas com diferentes cargas de volume e intensidade de exercício, diferentes momentos de início do protocolo de treinamento físico, bem como diferentes concentrações celulares injetadas e tempo de janela terapêutica para o transplante celular. As respostas para essas questões podem aumentar a evidência científica dos benefícios das terapias, isoladas ou integradas, contribuindo dessa forma para o avanço considerável da aplicação clínica, possibilitando aos pacientes que sofrem com insuficiência cardíaca após infarto uma melhor qualidade de vida.

## **6- CONCLUSÃO**

Os dados do presente trabalho permitem concluir que a associação treinamento físico aeróbio iniciado 24 horas após o infarto do miocárdio e terapia com células-tronco mesenquimais não foi capaz de alterar os parâmetros cardíacos, celulares e moleculares avaliados. Os tratamentos, avaliados de forma isolada, causaram adaptações benéficas que resultaram em melhora da função cardíaca geral. No entanto, ao serem combinados, não mostraram sinergia que pudesse potencializar seus benefícios.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adsett J, Mullins R. Evidence Based Guidelines for Exercise and Chronic Heart Failure. 2010. Suported by Queensland University.

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

Akhter SA, Luttrell LM, Rockman HA, Iaccarino G, Lefkowitz RJ, Koch WJ. Targeting the receptor–Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science* 1998; 280: 574–7.

Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y, Olivetti G. Myocardial Infarction in Rats Infarct Size, Myocyte Hypertrophy, and Capillary Growth. *Circ Res.* 1986; 58: 26-37.

Anversa P, Kajstura J, Rota M, Leri A. Regenerating new heart with stem cells. *J Clin Invest.* 2013; 123(1): 62-70.

Babbitt CJ, Pham CG, Shai SY, Ross RS. Integrin signaling in pressure overload hypertrophy. *Circulation.* 1999; 100(suppl I): I-560. Abstract.

Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cell: clinical application and biological characterization. *The international journal of biochemistry and cell biology.* 2004; 36: 568-584.

Belardinelli R, Georgiou D, Cianci G, Purcaro A. Randomized, controlled trial of long-term moderate exercise training in chronic heart failure: effects on functional capacity, quality of life, and clinical outcome. *Circulation.* 1999; 99(9):1173-82.

Belfort, FG. Influência do treinamento físico aeróbio associado à terapia com células-tronco mesenquimais na morfologia e função do ventrículo direito de ratos com infarto do miocárdio induzido no ventrículo esquerdo. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 2014.

Bernardo BC, Weeks KL, Lynette P, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacology & Therapeutics.* 2010; 128:191-227.

Berry MF, Engler AJ, Woo YJ, Pirolli TJ, Bish LT, Jayasankar V, Morine KJ, Gardner TJ, Discher DE, Sweeney HL. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 290(6): H2196-203.

Bitto V, de Waard MC, Biesmans L, Lenaerts I, Ozdemir S, Van Deel E. Early exercise training after myocardial infarction prevents contractile but not electrical remodeling or hypertrophy. *Cardiovascular Research.* 2010; 86:72–81.

Blair SN, Kohl HW, Barlow CE, Paffenbarger RS, Gibbons LW, Macera, CA. Changes in physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy and unhealthy men. *JAMA*. 1995; 273(14):1093-8.

Blomqvist CG, Saltin B. Cardiovascular adaptations to physical training. *Ann Rev Physiol*. 1983; 45: 169–189.

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

Brancaccio M, Hirsch E, Notte A, Selvetella G, Lembo G, Tarone G. Integrin signalling: The tug-of-war in heart hypertrophy. *Cardiovascular Research*. 2006; 60: 422 – 433.

Brower GL, Gardner JD, Forman MF et al. The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur. J. Cardiothorac. Surg*. 2006; **30**: 604–10.

Bueno OF, Wilkins BJ, Tymitz KM et al. Impaired cardiac hypertrophic response in calcineurin Ab-deficient mice. *Proc. Natl Acad. Sci*. 2002; 99: 4586–91.

Butler, D. UN Targets top killers. International summit considers how to stem the rise in non-communicable diseases. *Nature*. 2011; 477:260-261.

Campos JC, Queliconi BB, Dourado PMM, Cunha TF, Zambelli VO, Bechara LRG, et al. Exercise Training Restores Cardiac Protein Quality Control in Heart Failure. *Plos one*. 2012; 7(12): 1-12.

Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002; 31(296): 1655-1667.

Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J. Pathol*. 2009; 217: 318–324.

Carneiro Júnior, M. A. Treinamento físico de baixa intensidade e destreinamento: avaliação das propriedades morfológicas e mecânicas de miócitos cardíacos de ratos espontaneamente hipertensos. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2009.

Chicha L, Smith T, Guzman R. Stem cells for brain repair in neonatal hypoxia–ischemia. *Childs Nerv Syst*. 2013; 30: 37-46.

Chien KR, Knowlton KU et al. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J*. 1991; 5: 3037–3046.

Cleutjens JPM, Creemers EEJM. Integration of Concepts: Cardiac Extracellular Matrix Remodeling After Myocardial Infarction. *Journal of Cardiac Failure*. 2002; 8(6): S344-S348

Colan SD. Mechanics of left ventricular systolic and diastolic function in physiologic hypertrophy of the athlete's heart. *Cardiology Clinics*. 1997; 15(3): 355-371.

Cosmo S, Francisco JC, Cunha RC, Macedo RM, Faria-Neto JR, Simeoni R, et al. Efeito do exercício associado ao transplante de células-tronco sobre a função ventricular de ratos pós-infarto agudo do miocárdio. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2012; 27(4): 542-51.

Craenenbroeck EMV, Beckers PJ, Possemiers NM, Wuyts K, Frederix G, Hoymans VY, et al. Exercise acutely reverses dysfunction of circulating angiogenic cells in chronic heart failure. *European Heart Journal*. 2010; 3:1924–1934.

D'Angelo DD, Sakata Y, Lorenz JN et al. Transgenic Gaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc. Natl Acad. Sci*. 1997; 94: 8121–6.

de Waard MC, Van der Velden J, Bito V, Ozdemir S, Biesmans L, Boontje NM. Early Exercise Training Normalizes Myofilament Function and Attenuates Left Ventricular Pump Dysfunction in Mice With a Large Myocardial Infarction. *Circulation Research*. 2007; 100: 1079-1088.

DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, Muslin AJ. Akt1 Is Required for Physiological Cardiac Growth. *Circulation*. 2006; 113: 2097-2104.

DeSantiago J, Bare DJ, Semenov I, Minshall RD, Geenen DL, Wolska BM, et al. Excitation–contraction coupling in ventricular myocytes is enhanced by paracrine signaling from mesenchymal stem cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2012; 52(6): 1249–1256.

Dirkx E, Martins PAC, Windt LJ. Regulation of fetal gene expression in heart failure. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1832: 2414–2424.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 2002; 99(10): 3838-3843.

Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, doi:10.1016/j.yjmcc.2009.07.015.

Ellison GM, Vicinanza C, Smith AJ, Aquila I, Leone A, Waring CD, et al. Adult c-kitpos Cardiac Stem Cells Are Necessary and Sufficient for Functional Cardiac Regeneration and Repair. *Cell*. 2013; 154: 827–842.

Ellison GM, Waring CD, Vicinanza C, Torella D. Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms. *Heart*. 2012; 98:5-10.

Fagard R, Aubert A, Staessen J, Eynde EV, Vanhees L, Amery A. Cardiac structure and function in cyclists and runners: Comparative echocardiographic study. *British Heart Journal*. 1984; 52(2): 124-129.

Figuroa MS, Peters JI. Congestive Heart Failure: Diagnosis, Pathophysiology, Therapy, and Implications for Respiratory Care. *Respiratory care*. 2006; 51(4): 403-412.

Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI. Pulmonary Passage is a Major Obstacle for Intravenous Stem Cell Delivery: The Pulmonary First-Pass Effect. *Stem Cells and development*, 2009; 18(5): 683-692.

Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat. Qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *American Journal of Pathology*. 1978; 90: 57-70.

Fletcher PJ, Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Left Ventricular Diastolic Pressure-Volume Relations in Rats with Healed Myocardial Infarction: Effects on Systolic Function. *Circ Res*. 1981; 49: 618-626.

Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodeling. *Nature Reviews Cardiology*. 2014; 11: 255–265.

French BA, Kramer CM. Mechanisms of postinfarct left ventricular remodeling. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. 2008. doi:10.1016/j.ddmec.2007.12.006.

Gajarsa JJ, Kloner RA. Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities. *Heart Fail Rev*. 2011; 16: 13-21.

Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The Dynamic in vivo Distribution of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells after Infusion. *Cells Tissues Organs*. 2001; 169: 12–20.

Ghorayeb N, Costa RV, Daher DJ, Oliveira Filho JA, Oliveira MAB, et al. Diretriz em Cardiologia do Esporte e do Exercício da Sociedade Brasileira de Cardiologia e da Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte. *Arq Bras Cardiol*. 2013; 100(1Supl.2):1-41.

Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*. 1999; 285: 1028–1032.

Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008; 103: 1204–1219.

Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J. Clin. Invest*. 1975; 56: 56–64.

Gunasinghe, S. K., & Spinale, F. G. Myocardial basis for heart failure. In D. L. Mann. *Role of the Cardiac Interstitium Heart Failure*. 2004; 57–70. Philadelphia: Saunders.

Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Krankel N, Shu Y, Baither Y, Gielen S, Thiele H, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2003; 107: 3152–3158.

Hammerman H, Schoen FJ, Kloner RA. Short-Term Exercise Has a Prolonged Effect on Scar Formation After Experimental Acute Myocardial Infarction. *JACC*. 1983; 2(5): 979-982.

Haq S, Choukroun G, Lim H, Tymitz KM, del Monte F, Gwathmey J, et al. Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation*. 2001; 103(5): 670–677.

Haq S, Choukroun G, Kang ZB, Ranu H, Matsui T, Rosenzweig A., et al. Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Biol*. 2000; 151(1): 117–130.

Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Escalation Study of Intravenous Adult Human Mesenchymal Stem Cells (Prochymal) After Acute Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009; 54(24): 2277-2286.

Hashimoto NY, Fernandes T, Soci, UPR, Oliveira EM. Determinantes Moleculares da Hipertrofia Cardíaca Induzida por Diferentes Volumes de Treinamento Aeróbico. *Rev Bras Cardiol*. 2011; 24(3): 153-162.

Haskell WL, Lee IM, Pate RR, Powell KE, Blair SN, Franklin BA, Macera CA, Heath GW, Thompson PD, Bauman A. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med Sci Sports Exerc*. 2007; 39(8): 1423-34.

Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Stimulate Cardiac Stem Cell Proliferation and Differentiation. *Circulation Research*. 2010;107:913-922.

Haykowsky M, Scott J, Esch B, Schopflocher D, Myers J, Paterson I, Warburton D, Jones L, Clark AM. A meta-analysis of the effects of exercise training on left ventricular remodeling following myocardial infarction: start early and go longer for greatest exercise benefits on remodeling. *Trials*. 2011; 4: 12-92.

Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature reviews: molecular cell biology*. 2006; 7: 589-600.

Hochman JS, Healy B. Effect of Exercise on Acute Myocardial Infarction in Rats. *JACC*. 1986; 7(1): 126-132.

Holmes JW, Borg TK, Covell JW. Structure and mechanics of healing myocardial infarcts. *Annual Rev. Biomed. Eng*. 2005; 7:223–253.

Hosoda T. C-kit-positive cardiac stem cells and myocardial Regeneration. *Am J Cardiovasc Dis.* 2012; 2(1): 58-67.

Hynes, RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992; 69(1): 11-25.

Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Sakai S, Kobayashi T, Fujii N, et al. Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 2001; 281: R2029–R2036.

Jiang M, Mao J, He B. The effect of bone marrow-derived cells on diastolic function and exercise capacity in patients after acute myocardial infarction. *Stem Cell Research.* 2012; 9: 49–57.

Jin H, Yang R, Li W, Lu H, Ryan AM, Ogasawara AK, et al. Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279: H2994–H3002.

Jorge L, Rodrigues B, Rosa KT, Malfitano C, Loureiro TCA, Medeiros A, et al. Cardiac and peripheral adjustments induced by early exercise training intervention were associated with autonomic improvement in infarcted rats: role in functional capacity and mortality. *European Heart Journal*, 2011 Jul; 32:904–912.

Jouven X, Empana JP, Schwartz PJ, Desnos M, Courbon D and Ducimetiere P. Heart-rate profile during exercise as a predictor of sudden death. *N Engl J Med.* 2005; 352: 1951-8.

Jugdutt BI. Ischemia /Infarction. *Heart Failure Clin.* 2012; 8:43–51.

Kajstura J, Urbanek K, Perl S, Hosoda T, Zheng H, Ogorék B. Cardiomyogenesis in the Adult Human Heart. *Circ Res.* 2010; 107: 305-315.

Kemi OJ, Ceci M, Wisloff U, Grimaldi S, Gallo P, Smith GL, Condorelli G, Ellingsen O. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J Cell Physiol* 2008; 214: 316–321.

Kim, J., Wende, A. R., Sena, S., Theobald, H. A., Soto, J., Sloan, C., et al. Insulin like growth factor I receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy. *Mol Endocrinol.* 2008; 22(11): 2531–2543.

Kirschstein R. Stem cells: scientific progress and future research. Bethesda: The Nacional Institute of Health. Department of Health and Human Services. 2001.

Koziris LP, Hickson RC, Chatterton Jr RT et al. Serum levels of total and free IGF-I and IGFBP-3 are increased and maintained in long-term training. *J. Appl. Physiol.* 1999; 86: 1436–42.

Kraitchman DL, Tatsumi M, Gilson WD, Ishimori T, Kedziorek D, Walczak P, et al. Dynamic Imaging of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Trafficking to Myocardial Infarction. *Circulation*, 2005; 112:1451-1461.

Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, Miche E, Bohm M, Nickenig G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*. 2004; 109: 220–226.

Lavorato, VN. Efeitos do treinamento físico aeróbio associado à terapia com células-tronco mesenquimais sobre parâmetros cardiovasculares e propriedades mecânicas de cardiomiócitos em ratos com infarto do miocárdio experimental. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 2014.

Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci*. 2001; 114(16): 2903-2910.

Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, et al. Intravenous hMSCs Improve Myocardial Infarction in Mice because Cells Embolized in Lung Are Activated to Secrete the Anti-inflammatory Protein TSG-6. *Cell Stem Cell*. 2009; 5: 54–63.

Li Y, Yao Y, Sheng Z, Yang Y, Ma G. Dual-modal tracking of transplanted mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *International Journal of Nanomedicine*. 2011; 6: 815–823.

Lin RCY, Weeks KL, Gao XM, Williams RBH, Bernardo BC, Kiriazis H et al. PI3K(p110 $\alpha$ ) Protects Against Myocardial Infarction-Induced Heart Failure Identification of PI3K-Regulated miRNA and mRNA. *Thromb Vasc Biol*. 2010; 30:724-732.

Lloyd-Williams F, Mair FS, Leitner M. Exercise training and heart failure: a systematic review of current evidence. *British Journal of General Practice*. 2002; 52: 47-55.

Loennechen JP et al. Cardiomyocyte contractility and calcium handling partially recover after early deterioration during post-infarction failure in rat. *Acta Physiol Scand*. 2002; 176(1): 17-26.

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

Luo J, McMullen JR, Sobkiw CL et al. Class IA, phosphoinositide 3-kinase regulates heart size and physiological cardiac hypertrophy. *Mol. Cell. Biol*. 2005; 25: 9491–502.

Mann N, Rosenzweig A. Can Exercise Teach Us How to Treat Heart Disease? *Circulation*. 2012; 126: 2625-2635.

McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2007; 34:255–262.

McMullen JR, Shioi T, Huang WY et al. The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-Kinase (p110 $\alpha$ ) pathway. *J. Biol. Chem*. 2004; 279: 4782–93.

McMullen JR et al. Phosphoinositide 3-kinase(p110 $\alpha$ ) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc. Natl Acad. Sci*. 2003; 100: 12355–12360.

Mende I, Malstrom S, Tschlis PN, Vogt PK, Aoki M. Oncogenic transformation induced by membrane-target Akt2 and Akt3. *Oncogene*. 2001; 19(20): 4419-4423.

Mende U, Kagen A, Cohen A, Aramburu J, Schoen FJ, Neer EJ. Transient cardiac expression of constitutively active G $\alpha_q$  leads to hypertrophy and dilated cardiomyopathy by calcineurin-dependent and independent pathways. *Proc. Natl Acad. Sci*. 1998; 95: 13 893–8.

Mill JG, Stefanon I, dos Santos L, Baldo MP. Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression for heart failure. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2011 Sep; 44: 890-898.

Mill JG, Vassallo DV. Hipertrofia cardíaca. *Rev Bras Hipertens*. 2001; 8: 63–75.

Milliken MC, Stray-Gunderson J, Peshock RM, Katz J, Mitchell JH. Left ventricular mass as determined by magnetic resonance imaging in male endurance athletes. *Am J Cardiol*. 1988; 62: 301–305.

Mills WR, Mal N, Kiedrowski MJ, Unger R, Forudi F, Popovic ZB, et al. Stem cell therapy enhances electrical viability in myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2007; 42: 304–314.

Milner CM, Higman VA, Day AJ. TSG-6: a pluripotent inflammatory mediator? *Biochem. Soc. Trans*. 2006; 34: 446–450.

Moholdt T, Vold MB, Grimsmo J, Slørdahl SA, Wisløff U. Home-Based Aerobic Interval Training Improves Peak Oxygen Uptake Equal to Residential Cardiac Rehabilitation: A Randomized, Controlled Trial. *PLoS ONE*. 2012; 7: e41199.

Molkentin JD. Calcineurin–NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovascular Research*. 2004; 63: 467–475.

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 1998; 93: 215–28.

Mulder P, Boujedaini H, Richard V, Henry JP, Renet S, Munter K, et al. Long Term Survival and Hemodynamics After Endothelin A Receptor Antagonism and

Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition in Rats With Chronic Heart Failure: Monotherapy Versus Combination Therapy. *Circulation*. 2002; 106: 1159-1164.

Nadal-Ginard B, Ellison GM, Torella D. Absence of Evidence Is Not Evidence of Absence: Pitfalls of Cre Knock-Ins in the c-Kit locus. *Circ Res*. 2014; 115: 415-418.

Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287: H2670–H2676.

Narita T, Suzuki K. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure. *Heart Fail Ver*, 2014. DOI 10.1007/s10741-014-9435.

Nawata J, Ohno I, Itoyama S, Suzuki J, Miura S, Ikeda J, Shirato K. Differential expression of  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  and  $\alpha 5$  integrin subunits in acute and chronic stages of myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Res*. 1999; 43:371–381.

Neri Seneri GG, Boddi M, Modesti PA et al. Increased cardiac sympathetic activity and insulin-like growth factor-I formation are associated with physiological hypertrophy in athletes. *Circ. Res*. 2001; 89: 977–82.

Ni NC, Li RK, Weisel RD. The promise and challenges of cardiac stem cell therapy. *Semin Thoracic Surg*. 2014: <http://dx.doi.org/10.1053/j.semtcvs.2014.03.001>.

Nicolau JC, Timerman A, Marin-Neto JA, Piegas LS, Barbosa CJDG, Franci A, Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Angina Instável e Infarto Agudo do Miocárdio sem Supradesnível do Segmento ST. *Arq Bras Cardiol*. 2014; 102(3Supl.1):1-61

Nilsson BB, Westheim A, Risberg MA. Effects of Group-Based High-Intensity Aerobic Interval Training in Patients With Chronic Heart Failure. *Am J Cardiol*. 2008; 102:1361–1365.

Nocon M, Hiemann T, Müller-Riemenschneider F, Thalau F, Roll S, Willich SN. Association of physical activity with all-cause and cardiovascular mortality: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2008; 15(3): 239-46.

O’Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, Casey Jr DE, Chung MK, de Lemos JA, et al. ACCF/AHA Guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013; 61(4):78-140.

Ohnishi S, Sumiyoshi H, Kitamura S, Nagaya N. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *FEBS Letters*. 2007; 581: 3961–3966.

Ohtaki H, Ylostalo JH, Foraker JE, Robinson AP, Reger RL, Shioda S, Prockop DJ. Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/ immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008; 105: 14638–14643.

Oliveira EM, Krieger JE. Hipertrofia cardíaca e treinamento físico: Aspectos moleculares. *Hipertensão.* 2002; 5(2): 73-78.

Oliveira RSF, Ferreira JCB, Gomes ERM, Paixão NA, Rolim NPL, Medeiros A, Guatimosim S, Brum PC. Cardiac anti-remodelling effect of aerobic training is associated with a reduction in the calcineurin/NFAT signalling pathway in heart failure mice. *J Physiol.* 2009; 587(15): 3899–3910.

Orenstein TL, Parker TG, Butany JW, Goodman JM, Dawood F, Wen WH, et al. Favorable Left Ventricular Remodeling following Large Myocardial Infarction by Exercise Training. Effect on Ventricular Morphology and Gene Expression. *J. Clin. Invest.* 1995; 96: 858-866.

Oudit GY, Penninger JM. Cardiac regulation by phosphoinositide 3-kinases and PTEN. *Cardiovascular Research.* 2009; 82: 250–260.

Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, Crackower MA, Penninger JM, Backx PH. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2004; 37(2): 449-471.

Paffenbarger RS Jr, Hyde RT, Wing AL, Lee IM, Jung DL, Kampert JB. The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. *N Engl J Med.* 1993; 328(8):538-45.

Pate RR, Pratt M, Blair SN, Haskell WL, Macera CA, Bouchard C, Buchner D, Ettinger W, Heath GW, King AC, et al. Physical activity and public health. A recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. *JAMA.* 1995; 273(5): 402-7.

Pereira FEL. Hipertrofia cardíaca: aspectos morfológicos e patológicos. In: *Contratilidade miocárdica. Aspectos básicos e clínicos.* Editado por Vassallo, DV, Lima EG (eds.). São Paulo: Fundo Editorial BYK, 1993.

Perin EC, Dohmann HFR, Borojevic R, Silva SA, Sousa ALS, Silva GV, et al. Improved Exercise Capacity and Ischemia 6 and 12 Months After Transendocardial Injection of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells for Ischemic Cardiomyopathy. *Circulation.* 2004; 110[suppl II]: II-213–II-218.

Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation.* 1990; 81: 1161-1172.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner JRA, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res.* 1979; 44: 503-512.

Pham CG, Harpf AE, Keller RS, Vu HT, Shai SY, Loftus JC, Ross RS. Striated muscle-specific  $\beta$ 1D-integrin and FAK are involved in cardiac myocyte hypertrophic response pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 279: H2916–H2926.

Piegas LS, Feitosa G, Mattos LA, Nicolau JC, Rossi Neto JM, Timerman A, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Tratamento do Infarto agudo do Miocárdio com Supradesnível do Segmento ST. *Arq Bras Cardiol*. 2009; 93(6 supl.2): e179-e264.

Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal Stem Cells and Their Potential as Cardiac Therapeutics. *Circulation Research*. 2004; 95:9-20.

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

Portes LA, Tucci PJF. O Treinamento Físico por Natação Atenua o Remodelamento Miocárdico e Congestão Pulmonar em Ratas Wistar com Insuficiência Cardíaca Secundária a Infarto do Miocárdio. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2006; 87 (1): 54-59.

Proud CG. Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research*. 2004; 63: 403– 413.

Rajabi M, Kassiotis C, Razeghi P, Taegtmeyer H. Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis. *Heart Fail Rev*, 2007; 12:331–343.

Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*. 2002; 415: 206-212.

Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al; On behalf of the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics – 2012 Update: A report from the American Heart Association. *Circulation*. 2012 Dec; 125:2-220.

Rognmo O, Hetland E, Helgerud J, Hoff J, Slørdahl AS. High intensity aerobic interval exercise is superior to moderate intensity exercise for increasing aerobic capacity in patients with coronary artery disease. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation* . 2004, 11: 216–222.

Ross RS, Borg TK. Integrins and the Myocardium. *Circ Res*. 2001; 88: 1112-1119.

Ross RS, Pham C, Shai SY, Goldhaber JI, Fenczik C, Glembotski CC, Ginsberg MH, Loftus JC. Beta1 Integrins participate in the hypertrophic response of rat ventricular myocytes. *Circ Res*. 1998; 82: 1160 –1172

Russo V, Young S, Hamilton A, Amsden BG, Flynn LE. Mesenchymal stem cell delivery strategies to promote cardiac regeneration following ischemic injury. *Biomaterials*. 2014; 35: 3956 – 3974.

Ruster B, Gottig S, Ludwig RJ, Bistrrian R, Muller S, Seifried E, et al. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*. 2006; 108: 3938-3944.

Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: Results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. 1978; 58(6): 1072-83.

Sato H, Delbridge LM, Blatter LA, Bers DM. Surface: volume relationship in cardiac myocytes studied with confocal microscopy and membrane capacitance measurements: species-dependence and developmental effects. *Biophys J*. 1996; 70(3): 1494-504.

Schaible T, Malhorta A, et al. Chronic swimming reverses cardiac dysfunction and myosin abnormalities in hypertensive rats. *J Appl Physiol*. 1986, 60: 1435–1441.

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

Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, Yang VK, Cai L, MeiWang, Wu TD et al. Mammalian heart renewal by pre-existing Cardiomyocytes. *Nature*. 2012; doi:10.1038/nature11682.

Shah VK, Shalia KK. Stem Cell Therapy in Acute Myocardial Infarction: A Pot of Gold or Pandora's Box. *Stem Cells International*. 2011; 1-20.

Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, et al. Mesenchymal Stem Cell Implantation in a Swine Myocardial Infarct Model: Engraftment and Functional Effects. *Ann Thorac Surg*. 2002; 73: 1919–26.

Shephard RJ, Balady GJ. Exercise as Cardiovascular Therapy. *Circulation*. 1999; 99: 963-972.

Shioi T, Kang PM, Douglas PS et al. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J*. 2000; 19: 2537–48.

Shimoyama, M, Hayashi D, Takimoto E, Zou Y, Oka T, Uozumi H, et al. Calcineurin plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation*. 1999; 100(24): 2449–2454.

Shiojima I, Walsh K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. *Genes Dev* 2006; 20: 3347–3365.

Smart NA, Dieberg G, Giallauria F. Intermittent versus continuous exercise training in chronic heart failure: A meta-analysis. *International Journal of Cardiology*. 2013; 166: 352–358.

Soci UP, Fernandes T, Hashimoto NY, Mota GF, Amadeu MA, Rosa KT, Irigoyen MC, Phillips MI and Oliveira EM. MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. *Physiol Genomics*, 43:665-73, 2011.

Soonpaa MH, Kim KK, Pajak L, Franklin M, Field LJ. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am. J. Physiol.* 1996; 271: H2183–9.

Souza CF, Napoli P, Han SW, Lima VC, Carvalho ACC. Células-Tronco Mesenquimais: Células Ideais para a Regeneração Cardíaca? *Rev Bras Cardiol Invasiva.* 2010; 18(3): 344-53.

Straburzyńska-Migaj E, Popiel M, Grajek S, Katarzyńska-Szymańska A, Lesiak M, Bręborowicz P, Bręborowicz P, et al. Exercise capacity, arrhythmic risk profile, and pulmonary function is not influenced by intracoronary injection of Bone Marrow Stem Cells in patients with acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology.* 2012; 159: 134–138.

Strauer BE, Yousef M, Schannwell CM. The acute and long-term effects of intracoronary Stem cell Transplantation in 191 patients with chronic heart failure: the STAR-heart study. *European Journal of Heart Failure.* 2011; 12: 721–729.

Sutton MGSJ, Sharpe N. Therapy Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction : Pathophysiology and Therapy. *Circulation.* 2000; 101: 2981-2988.

Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999; 79(1): 215-262.

Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD; the Writing Group on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. *Circulation.* 2012; 126: 000-000.

Timmers L, Limb SK, Arslan F, Armstrong JS, Hofer IE, Doevendans PA, et al. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Research.* 2008; 1: 129–137.

Trueblood NA, Inscore PR, Brenner D, Lugassy D, Apstein CS, Sawyer DB, et al. Biphasic temporal pattern in exercise capacity after myocardial infarction in the rat: relationship to left ventricular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 288: H244–H249.

Tucci PJ. Pathophysiological characteristics of the post-myocardial infarction heart failure model in rats. *Arq Bras Cardiol.* 2011; 96(5): 420-4.

Urbanek K, Rota M, Cascapera S, Bearzi C, Nascimbene A, Angelis A, et al. Cardiac Stem Cells Possess Growth Factor-Receptor Systems That After Activation Regenerate the Infarcted Myocardium, Improving Ventricular Function and Long-Term Survival. *Circ Res.* 2005; 97: 663-673.

van Berlo JH, Kanisicak O, Maillet M, Vagnozzi RJ, Karch J, Lin SCJ, Middleton RC, et al. c-kit<sup>+</sup> cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature.* 2014; 509: 337-352.

Van den Akker F, Deddens JC, Doevendans PA, Sluiter JPG. Cardiac stem cell therapy to modulate inflammation upon myocardial infarction. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013, 1830: 2449–2458.

van Tol BAF, Huijsmans RJ, Kroon DW, Schothorst M, Kwakkel G. Effects of exercise training on cardiac performance, exercise capacity and quality of life in patients with heart failure: A meta-analysis. *European Journal of Heart Failure*. 2006; 8: 841 – 850.

Wang N, Shao Y, Mei Y, Zhang Li, Li Q, Li D, Shi S et al. Novel mechanism for mesenchymal stem cells in attenuating peritoneal adhesion: accumulating  $\alpha$ -stimulating gene-6 in the lung and secreting tumor necrosis factor. *Stem Cell Research & Therapy*. 2012; 3:51.

Warburton DER, McKenzie DC, Haykowsky MJ, Taylor A, Shoemaker P, Ignaszewski AP, Chan SY. Effectiveness of High-Intensity Interval Training for the Rehabilitation of Patients With Coronary Artery Disease. *Am J Cardiol*. 2005; 95: 1080–1084.

Waring CD, Vicinanza C, Papalamprou A, Smith AJ, Purushothaman S, Goldspink DF, et al. The adult heart responds to increased workload with physiologic hypertrophy, cardiac stem cell activation, and new myocyte formation. *European Heart Journal*. 2012: 2-10.

Weeks KL, Gao X, Du XJ, Boey EJH, Matsumoto A, Bernardo BC et al. Phosphoinositide 3-Kinase  $p110\alpha$  Is a Master Regulator of Exercise-Induced Cardioprotection and PI3K Gene Therapy Rescues Cardiac Dysfunction. *Circ Heart Fail*. 2012; 5: 523-534.

Weeks KL, McMullen JR. The Athlete's Heart vs. the Failing Heart: Can Signaling Explain the Two Distinct Outcomes? *Physiology*. 2011; 26: 97-105.

Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG. Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol*. 1994; 89: 397-410.

Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF et al. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ. Res*. 2004; 94: 110–18.

Wilkins, BJ, Molkenin, JD. Calcium–calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004; 322:1178–1191.

Wisloff U, Loennechen JP, et al. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility,  $Ca^{2+}$  sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2002; 54(1): 162-174.

Wisløff U, Støylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognum O, Haram PM, et al. Superior Cardiovascular Effect of Aerobic Interval Training Versus Moderate Continuous Training in Heart Failure Patients: A Randomized Study. *Circulation*. 2007; 115: 3086-3094.

Wisniewski HG, Vilcek J. Cytokine-induced gene expression at the crossroads of innate immunity, inflammation and fertility: TSG-6 and PTX3/ TSG-14. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15: 129–146.

Wollert KC, Drexler H. Clinical Applications of Stem Cells for the Heart. *Circulation Research.* 2005 Feb; 96:151-163.

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

Xu X, Wan W, Powers AS, Li J, Ji LL, Lao S, et al. Effects of exercise training on cardiac function and myocardial remodeling in post myocardial infarction rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2008; 44: 114–122.

Yamashita N, Baxter GF, Yellon DM. Exercise directly enhances myocardial tolerance to ischaemia–reperfusion injury in the rat through a protein kinase C mediated mechanism. *Heart.* 2001; 85: 331–336.

Yeginsu A, Ergin M. Determination of optimal drying period in wet to dry weight ratio measurement. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi.* 2010; 58(1): 115-116.

Yeh JK, Aloia JF, Chen M, Ling N, Koo HC, Millard WJ. Effect of growth hormone administration and treadmill exercise on serum and skeletal IGF-I in rats. *Am. J. Physiol.* 1994; 266: E129–35.

Yengo CM, Zimmerman SD, mccormick RJ, Thomas DP. Exercise Training Post-MI Favorably Modifies Heart Extracellular Matrix in the Rat. *Medicine and Science in Sports and Exercise.* 2012: 1005-1012.

Yi TG, Song SU. Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Applications. *Arch Pharm Res.* 2012; 35(2): 213-221.

Zak R. *Growth of the Heart in Health and Disease.* Raven Press. 1984.

Zhai P, Gao S, Holle E, Yu X, Yatani A, Wagner T et al. Glycogen synthase kinase-3 $\alpha$  reduces cardiac growth and pressure overload-induced cardiac hypertrophy by inhibition of extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem.* 2007; 282(45): 33181–33191.

Zhang LQ, Zhang XQ, Yuk-Chow NG, Rothblum LI, Musch TI, Moore RL, et al. Sprint training normalizes Ca<sup>2+</sup> transients and SR function in postinfarction rat myocytes. *J Appl Physiol.* 2000; 89: 38–46.

Zhang YM, Lu Y, Tang Y, Yang D, Wu HF, Bian ZP, Xu JD, Gu CR, Wang LS, Chen XJ. The effects of different initiation time of exercise training on left ventricular remodeling and cardiopulmonary rehabilitation in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Disabil Rehabil.* 2015; 17:1-9.

Zornoff LAM, Paiva SAR, Duarte DR, Spadaro J. Remodelação Ventricular Pós-Infarto do Miocárdio: Conceitos e Implicações Clínicas. Arq Bras Cardiol. 2009; 92(2): 157-164.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell. 2002; 13(12): 4279-4295.

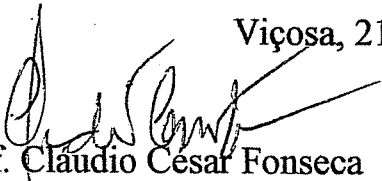
## CERTIFICADO

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

## CERTIFICATE

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

Viçosa, 21 de fevereiro de 2013

  
Prof. Cláudio César Fonseca  
Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV