

Efeito do exercício associado ao transplante de células-tronco sobre a função ventricular de ratos pós-infarto agudo do miocárdio

Effect of exercise associated with stem cell transplantation on ventricular function in rats after acute myocardial infarction

Simone Cosmo¹, Julio César Francisco², Ricardo Correa da Cunha³, Rafael Michel de Macedo⁴, José Rocha Faria-Neto⁵, Rossana Simeoni⁶, Katherine Athayde Teixeira de Carvalho⁷, Marcia Olandoski⁸, Nelson Itiro Miyague⁹, Vivian Ferreira do Amaral¹⁰, Luiz César Guarita-Souza¹¹

DOI: 10.5935/1678-9741.20120096

RBCCV 44205-1421

Resumo

Objetivo: Avaliar o efeito da associação terapêutica entre o transplante autólogo de células-tronco e o exercício físico aquático, sobre a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) de ratos com disfunção ventricular pós-infarto agudo do miocárdio (IAM).

Métodos: Foram induzidos ao IAM, por ligadura da artéria coronária esquerda, 21 ratos Wistar. Os animais foram submetidos à ecocardiografia para avaliação da FEVE (%) e dos volumes diastólico e sistólico finais do ventrículo esquerdo (VDF, VSF, ml), randomizados e ao transplante das células-tronco mononucleares. Os animais foram divididos em quatro grupos: grupo sedentário sem células (n=5), sedentário com células (n=5), treinado sem células (n=5) e treinado com células (n=6). O treinamento físico foi iniciado 30 dias após o IAM e realizado em piscina adaptada durante 30 dias. No início e no final do protocolo de treinamento físico,

foram realizadas dosagens de lactato. Os animais foram submetidos a nova ecocardiografia após 60 dias do IAM.

Resultados: Comparação dos valores de FEVE 30 dias e 60 dias pós-IAM, respectivamente: sedentário sem (35,20 ± 7,64% vs. 22,39 ± 4,56% $P=0,026$), com células (25,18 ± 7,73% vs. 23,85 ± 9,51% $P=0,860$) e no treinado sem (21,49 ± 2,70% vs. 20,71 ± 7,14% $P=0,792$), treinado com células (28,86 ± 6,68 vs. 38,43 ± 7,56% $P=0,062$). Identificou-se a diminuição de fibras colágenas, nas regiões de fibrose miocárdica no grupo treinado com e sem células.

Conclusão: A associação terapêutica entre exercício físico e o transplante autólogo de células-tronco foi benéfica contra as ações do remodelamento ventricular.

Descritores: Infarto do miocárdio. Transplante de células-tronco. Exercício.

1. Bióloga, aluna do Mestrado da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR, Brasil. Execução do projeto.
2. Bioquímico da PUCPR. Execução do projeto, coleta de sangue da medula óssea.
3. PhD, Universidade Positivo, Curitiba, PR, Brasil. Orientação da metodologia da atividade física aquática.
4. PhD, PUCPR, Curitiba, PR, Brasil. Desenvolvimento da metodologia e discussão.
5. PhD, PUCPR, Curitiba, PR, Brasil. Revisão do artigo, metodologia e discussão.
6. PhD, PUCPR, Curitiba, PR, Brasil. Isolamento das células mononucleares.
7. MD, PhD; Pequeno Príncipe Faculty Institute e Paraná Federal University, Curitiba, PR, Brasil. Auxílio na metodologia do isolamento das células.
8. PhD, PUCPR, Curitiba, PR, Brasil. Análise estatística.
9. MD, PhD, PUCPR, Curitiba, PR, Brasil. Realização dos exames ecocardiográficos.

10. PhD, PUCPR, Curitiba, PR, Brasil. Discussão do artigo.
11. PhD, Professor Adjunto, PUCPR, Curitiba, PR, Brasil. Orientação do projeto.

Trabalho realizado na Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

Endereço para correspondência:
Luiz César Guarita-Souza
Rua Rosa Kaint Nadolny, 190 – 5º andar
Curitiba, PR, Brasil - CEP: 81200-525
E-mail: guaritasouzal@hotmail.com

Apoio: CNPq

Artigo recebido em 8 de maio de 2012
Artigo aprovado em 27 de setembro de 2012

Abreviaturas, acrônimos & símbolos	
ANOVA	Análise de variância
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
H&E	Hematoxilina-eosina
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Media
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
rpm	Rotações por minuto
SBF	Soro bovino fetal
SD com	Grupo infartado sem exercício, sedentário, com células
SD sem	Grupo infartado sem exercício, sedentário
TR com	Grupo infartado treinado, com células
TR sem	Grupo infartado treinado, sem células
VDF	Volume diastólico final
VE	Ventrículo esquerdo
VSF	Volume sistólico final

Abstract

Objective: To analyze the functional and anatomical-pathological effect of transplantation of bone marrow mononuclear cells associated to aquatic physical activity after myocardial infarction in rats.

Methods: Twenty-one rats were induced by myocardial infarction, through left coronary artery ligation. After a week, the animals were subjected to echocardiography

for evaluation of left ventricle ejection fraction (LVEF, %) and diastolic and end systolic volume of the left ventricle (EDV, ESV, ml), randomized and the transplantation of mononuclear stem cells. The animals were divided into four groups: sedentary group without cells (n=5), sedentary with cells (n=5), trained without cells (n=5) and trained with cells (n=6). The physical training was started 30 days after infarction and held in swimming during 30 days. At the beginning and at the end of the physical training protocol were held assay of lactate. The animals have been subjected to new echocardiography after 60 days of myocardial infarction.

Results: Two months after the transplant, were observed decrease in FE in the control group (35.2 to 23.54 $P=0.022$) and addition of LVEF and stabilization of ventricular remodeling in the group trained with cells (29.85 to 33.43% $P=0.062$ and 0.71 to 0.73 ml, $P=0.776$, respectively). Identified the reduction of collagen fibers, myocardial fibrosis regions in the group trained with and without cells.

Conclusion: The group trained with cells improves ventricular function compared to the control group, suggesting the benefit of associated cell therapy will physical activity.

Descriptors: Myocardial infarction. Stem cell transplantation. Exercise.

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares, principal causa de morte no mundo, constituem-se nas principais causas de morbimortalidade, sendo o infarto agudo do miocárdio (IAM) a mais frequente dentre as doenças isquêmicas do coração. Os avanços tecnológicos na terapêutica e no diagnóstico têm aumentado muito a sobrevida dos pacientes, contudo as opções disponíveis para o tratamento do IAM ainda são paliativas e limitadas, evidenciando a necessidade de desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas [1,2].

Apesar de alguns autores sugerirem que haja divisão mitótica do coração, a grande maioria dos cardiomiócitos não tem capacidade de regeneração após o IAM e, quando isto ocorre, existe deterioração da atividade contrátil e, sendo a área do IAM extensa, pode ocorrer o remodelamento ventricular e a insuficiência cardíaca [3].

Estudos experimentais indicam a possibilidade de regeneração miocárdica por meio de transplante de células-tronco, como alternativa para o tratamento dessa enfermidade. Em modelos experimentais de isquemia miocárdica aguda e crônica, o implante de células mononucleares de medula óssea foi capaz de melhorar a contração e a perfusão miocárdica. Tais resultados foram reproduzidos em estudos clínicos recentes em humanos [4,5].

Exercícios físicos sistematicamente realizados resultam em grande parte em mudanças no organismo. As mudanças têm o seu lugar ao nível das estruturas celulares, dos tecidos e do corpo como um todo. As mudanças estendem-se desde os processos metabólicos celulares com seus mecanismos moleculares até a capacidade funcional das estruturas celulares dos órgãos e de seus sistemas. Alterações pronunciadas têm sido encontradas em relação aos mecanismos de controle das funções corporais e dos processos metabólicos, incluindo os níveis de autorregulação celular, hormonal e neural [6].

Dessa forma, buscamos avaliar se a atividade física aquática associada ao transplante de células mononucleares da medula óssea também no IAM apresenta esse mesmo benefício. O objetivo deste estudo é analisar o efeito funcional e anatomopatológico do transplante de células-tronco da medula óssea associada à atividade física aquática pós-IAM com disfunção ventricular em ratos Wistar.

MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Centro de Cirurgia e Diagnóstico do Laboratório Experimental de Técnica Cirúrgica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), após ter sido aprovada pelo Comitê de Ética

em Pesquisa (registro no CEUA/ PUCPR nº 434), com animais provenientes do biotério da PUCPR, segundo os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal [7].

Foram utilizados 30 ratos Wistar machos, pesando entre 260 e 300 g. Os ratos foram mantidos agrupados e armazenados em gaiolas de polipropileno em ambiente com temperatura (22°C – 24°C) e luz controladas, sob ciclos claro/escuro (12/12h), e água ad libitum. Todos os animais foram submetidos a indução do IAM. Após sete dias, os mesmos foram submetidos a análise ecocardiográfica e os animais que apresentavam fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) abaixo de 35% foram incluídos no estudo (n=21). Os demais nove animais morreram em decorrência de IAM extenso. Nesse momento, os animais foram randomizados e divididos em quatro grupos experimentais, a seguir relacionados:

- Grupo I: Infartado sem exercício, sedentário (SD sem). Os animais foram acompanhados por 60 dias (n = 5);
- Grupo II: Infartado sem exercício, sedentário, com células (SD com). Os animais foram transplantados com células mononucleares da medula óssea e acompanhados por 60 dias (n = 5);
- Grupo III: Infartado treinado sem células (TR sem). Os animais foram submetidos a atividade física durante 15 minutos, três vezes por semana e acompanhados por 60 dias (n = 5);
- Grupo IV: Infartado treinado com células (TR com). Os animais foram transplantados com células mononucleares da medula óssea e submetidos a atividade física durante 15 minutos, três vezes por semana e acompanhados por 60 dias (n = 6).

A atividade física teve início 30 dias após indução do IAM, após um período de adaptação aquática.

Descrição do procedimento

Todos os ratos do experimento foram submetidos a anestesia geral com a associação de ketamina e xilazina (50 mg/kg), por via intramuscular. Após indução anestésica, foi observada ausência do reflexo ocular palpebral. Com o relaxamento do animal, foi obtida uma via aérea definitiva através da intubação orotraqueal com cateter venoso periférico número 14. Após cada procedimento cirúrgico, a patência da via aérea foi verificada, conectando-se o cateter ao sistema de ventilação mecânica com volume de 2,5 ml (O₂/min.) e frequência de 50 ciclos por minuto, observando-se a expansão dos pulmões.

Em seguida, foram realizadas antissepsia do tórax com iodopovidona tópica e toracotomia lateral esquerda, no terceiro espaço intercostal. Após abertura da pleura esquerda, o animal foi conectado ao sistema de ventilação mecânica. Foram utilizados respiradores a volume (Harvard®, Inc., respirador modelo 683, Massachusetts,

USA) para animais de pequeno porte, com oxigênio a 21% (ar ambiente). O pericárdio foi aberto para luxação e melhor visualização da área a ser abordada. Após a exteriorização do coração, a aurícula esquerda foi afastada e a artéria coronária esquerda ligada com fio de sutura polipropileno azul monofilamentar não absorvível 7.0, entre a via saída da artéria pulmonar e o átrio esquerdo. A região infartada foi imediatamente visualizada pela diferença de coloração da área afetada. Em seguida, o coração foi reposicionado ao tórax, os pulmões hiperinsuflados e a parede torácica suturada por planos com fio de sutura mononáilon monofilamentar não absorvível 4.0. Após a recuperação da anestesia, os animais foram mantidos em gaiolas, alimentados com ração comercial padrão e livre acesso à água.

Ecocardiografia

Os animais foram analisados com equipamento de ecocardiografia bidimensional modelo Sonos 5500 (Hewlett Packard, USA), com transdutores setorial S12 (5-12 mHz) e linear 15L6 (7-15 mHz). Todos os animais, independente do grupo a que pertenciam, foram anestesiados com ketamina e xilazina, na dose de 25 mg/kg e 5 mg/kg, via intramuscular, para a realização do exame. Todos os animais foram submetidos a ecocardiografia no 7º, 30º e 60º dias pós-lesão miocárdica, com o intuito de acompanhar a evolução do IAM. Todos os animais foram monitorizados nas derivações periféricas com eletrodos pediátricos, obtendo-se a frequência cardíaca com visualização cardioscópica. O transdutor foi colocado na porção ventrolateral esquerda da parede torácica, as imagens foram vistas em duas dimensões, e as câmaras ventriculares visualizadas em dois cortes, transversal e longitudinal. No corte longitudinal, foi obtida visão axial do ventrículo esquerdo (VE), incluindo valva mitral, valva aórtica, parede anterior, posterior e ápice do VE; enquanto que, no corte transversal, observou-se a parede septal, anterior, lateral e posterior na região basal média e apical do VE. Os parâmetros analisados foram: FEVE (%), volume diastólico final (VDF) do VE e volume sistólico final (VSF) do VE. As medidas foram obtidas pelo método de Simpson, utilizando o *software* do computador, tanto na sístole como na diástole. Todas as medidas foram feitas três vezes pelo mesmo observador, de forma cega, tendo como resultado final a média das três.

Obtenção do sangue da medula óssea

Após 7 dias do IAM, foi realizada a obtenção do sangue da medula óssea. Para tal, foi utilizado o método de punção-aspiração na medula óssea dos ratos de forma autóloga, sempre precedida de anestesia: ketamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Os animais foram colocados em posição de decúbito lateral, com a perna superior flexionada

e a inferior reta. A punção-aspiração foi realizada na crista ilíaca posterior do fêmur com seringa descartável (BD-Plastipak®) de 5 mL, com 0,2 mL de heparina (5.000 UI/mL), com agulha 25X8 21 mm G1 (BD- Precision Glide®); foi coletado cerca de 1 mL do sangue da medula óssea de cada rato, seguida de identificação das seringas [8].

Isolamento das células da medula óssea, fração mononuclear

Para o isolamento da fração mononuclear utilizou-se o gradiente de densidade ($d=1,077 \text{ g/m}^3$) (Ficoll-Hypaque -Sigma, St. Louis, MO) de acordo com Böyum, em meio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM-GIBCO BRL) suplementado com 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e 20% de solução tampão. O material coletado de cada rato foi colocado em tubo estéril de centrifuga de plástico de 15 mL. Logo após, completado esse tubo até 12 mL, com meio de cultura IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Media*), suplementado com solução tampão 4% e antibiótico (penicilina e estreptomicina) 1% e homogeneizado. Em um tubo de plástico de 15 mL, foram colocados 3 mL de solução de separação por gradiente de densidade ($d: 1,077$) (Ficoll-Hypaque) e, logo em seguida, adicionado o homogeneizado contendo a medula óssea do animal e meio de cultura IMDM, cuidadosamente para que esta não se misturasse [8,9].

Esse tubo foi levado à centrífuga e submetido a 1400 rotações por minuto (rpm), durante 40 minutos, a 22°C. Logo após, levado a fluxo novamente, e retirado o anel formado entre o meio e o gradiente. Esse homogeneizado foi retirado, onde se encontravam as células-tronco mononucleares, foram colocados em outro tubo de plástico de 15 mL. Foi completado com meio IMDM até 15 mL e centrifugado novamente por 1500 rpm, por 10 minutos, a 22°C. Após retirada do tubo da centrífuga, foi realizado descarte rapidamente do sobrenadante. Observou-se um precipitado no fundo do frasco, sendo este as células-tronco mononucleares. Repetida a etapa anterior e colocando 13 mL de meio no tubo, o precipitado foi ressuspenso e centrifugado novamente a 1500 rpm, por mais 10 minutos, a 22°C. Após essa fase, foi descartado o sobrenadante, colocados 3 mL de meio no tubo e ressuspendidas as células, para contagem destas. Essa contagem foi realizada em câmara de Neubauer e analisada em microscópio óptico Olympus® CX31 em objetiva de 40X [8].

Transplante das células

As células derivadas da medula óssea, fração mononuclear foram suspensas no IMDM, contendo 20% de soro bovino fetal (SBF, Gibco BRL, Grand Island, NY) e 1% de antibiótico (100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL estreptomicina). O transplante das células foi realizado no mesmo dia da punção da medula óssea, na área de transição

entre o IAM e o miocárdio íntegro, na parede anterior do VE. A infusão foi de 15 µL de células, na concentração de 5×10^6 , usando seringa de Hamilton (1701 LT, Hamilton Bonaduz AG).

Exercício

Protocolo de adaptação

A atividade física com natação foi realizada em ambiente com temperatura controlada a 30°C, usando uma piscina de 85 cm de comprimento por 30 cm de largura por 50 cm de altura. Os animais foram adaptados antes do treinamento durante 10 minutos em três diferentes níveis de coluna de água: primeiro dia com 20 cm, segundo dia 30 cm e último dia 40 cm [10].

Protocolo de treinamento

A atividade física com natação ocorreu por 30 dias nos grupos treinados. Os animais se exercitaram durante 15 minutos por dia, durante três dias por semana. O início da atividade ocorreu após 30 dias do IAM. O mesmo tempo foi respeitado para o grupo de animais controle, ou seja, sem exercício [10].

Análise sanguínea do lactato

As amostras de sangue (25 µL) foram coletadas da cauda do animal, para quantificação do exercício. As coletas foram realizadas em dois períodos: no primeiro dia da atividade física, sendo considerados dados basais e 30 dias após as atividades físicas. Os ratos que se exercitaram foram submetidos ao teste imediatamente antes e depois da atividade física. Foram analisados os grupos treinados com e sem células. A concentração de lactato foi determinada através do lactímetro portátil (Accutrend). Os grupos sedentários com e sem células passaram pela análise da concentração do lactato, com objetivo de ampliar o controle da amostra.

Eutanásia

Todos os animais que foram submetidos à eutanásia receberam a dose letal (DL50) (148 mg/kg) do anestésico ketamina [11]. As amostras foram enviadas para análise anatomopatológica.

Estudo anatomopatológico

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

Foi realizada desidratação dos cortes, sendo estes submetidos a banhos sucessivos em álcool 70%, 80%, 90%, três banhos em álcool 100% (Leica modelo TP1020), durante uma hora. Logo após, impregnada

parafina líquida nos cortes através de três banhos a 65°C, no mesmo aparelho. Em seguida, os cortes histológicos foram montados em lâminas e corados com solução de hematoxilina-eosina (H&E) e Picosirius Red. De cada fragmento foram realizadas duas lâminas com os quatro cortes e com as colorações citadas.

Análise morfométrica

A análise morfométrica foi realizada no 60º dia após o IAM, uma vez que os marcadores estavam direcionados para fase crônica da cicatrização. Foi realizada análise do colágeno, corando-se os cortes histológicos pela técnica de H&E e examinou-se em microscopia óptica. Examinaram-se as lâminas com conhecimento da identificação conhecida, em microscópio óptico (Olympus BX40), aumento de 200 X, acoplado a uma câmera Sony® e a um computador. Utilizou-se um *software* de análise de imagens digitais *Image Pro-plus®* for Windows.

As imagens das lâminas foram capturadas para posterior análise em computador e, com auxílio do programa *Image pro-plus®*, as áreas selecionadas de interesse foram mensuradas.

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

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

Análise estatística

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

RESULTADOS

Análise ecocardiográfica intragrupo

Com relação à FEVE, identificou-se diminuição desse parâmetro nos grupos sedentário sem e com células e no grupo treinado sem células 60 dias após o IAM ($35,20 \pm 7,64\%$ vs. $22,39 \pm 4,56\%$ $P=0,026$ e $25,18 \pm 7,73\%$ vs.

$23,85 \pm 9,51\%$ $P=0,860$ e $21,49 \pm 2,70\%$ vs. $20,71 \pm 7,14\%$ $P=0,792$, respectivamente). Com relação ao grupo treinado com células, identificou-se aumento desse parâmetro de $29,85 \pm 6,68\%$ vs. $33,43 \pm 7,56\%$, $P=0,246$ (Figura 1).

Com relação ao VS, identificou-se aumento desse parâmetro nos grupos sedentário sem e com células e no grupo treinado sem células 60 dias após o IAM ($0,39 \pm 0,15$ ml vs. $0,65 \pm 0,12$ ml $P=0,020$; $0,50 \pm 0,07$ ml vs. $0,98 \pm 0,12$ ml $P=0,018$; $0,50 \pm 0,09$ ml vs. $0,64 \pm 0,05$ ml $P=0,014$, respectivamente). Com relação ao grupo treinado com células, identificou-se diminuição desse parâmetro de $0,61 \pm 0,14$ ml vs. $0,59 \pm 0,22$ ml ($P=0,872$).

Com relação ao VDF, identificou-se aumento desse parâmetro nos quatro grupos estudados 60 dias após o IAM: sedentário sem e com células e treinado sem e com células ($0,59 \pm 0,19$ ml vs. $0,83 \pm 0,13$ ml $P=0,117$; $0,89 \pm 0,13$ ml vs. $1,25 \pm 0,20$ ml $P=0,033$ $0,70 \pm 0,14$ ml vs. $0,82 \pm 0,09$ ml $P=0,058$; $0,71 \pm 0,13$ ml vs. $0,73 \pm 0,06$ ml $P=0,776$, respectivamente).

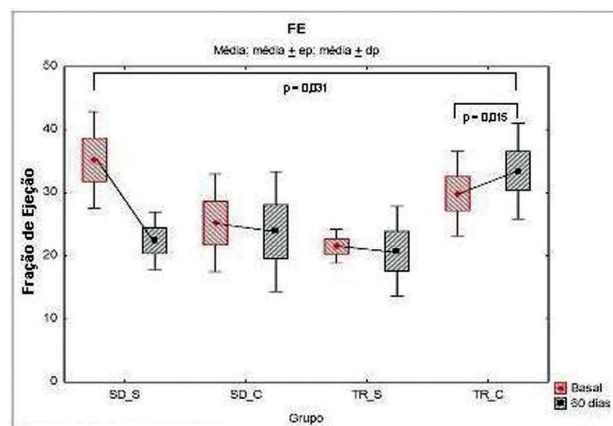


Figura 1- Fração de ejeção dos grupos: SD_S (Sedentários sem células), SD_C (Sedentários com células), TR_S (Treinados sem células), TR_C (Treinados com células).

Fig. 1. Fração de ejeção do ventrículo esquerdo

Análise ecocardiográfica intergrupos

Comparando-se os quatro grupos entre si, foi identificada diferença estatisticamente significativa dos valores ecocardiográficos de 30 dias após o IAM nos parâmetros de FEVE e VDF do VE.

Com relação à FEVE 30 dias após o IAM, identificou-se que os grupos não eram homogêneos ($P=0,022$), dessa forma foi utilizada uma análise de covariância. Quando analisados os resultados em 60 dias após o IAM, identificou-se diferença estatisticamente significativa apenas quando se compararam os grupos sedentários sem células com os treinados com células ($P=0,031$) e os grupos treinados com e sem células ($P=0,015$).

Tabela 1. Lactato.

Variável	Grupo	n	Média	Desvio padrão	Valor de P (comparação dos 4 grupos)
Lactato basal	SD sem cel	5	2,50	1,28	0,016
	SD com cel	5	4,28	1,04	
	TR sem cel	5	3,70	0,80	
	TR com cel	6	4,50	0,67	
Lactato 30 dias	SD sem cel	5	3,28	0,64	0,019
	SD com cel	5	3,00	1,27	
	TR sem cel	5	3,40	1,46	
	TR com cel	6	5,98	1,83	

Tabela 2. Lactato.

Comparação dos grupos dois a dois	Pré	Pós
SD sem x SD com	0,009	0,762
SD sem x TR sem	0,065	0,897
SD sem x TR com	0,003	0,007
SD com x TR sem	0,354	0,666
SD com x TR com	0,710	0,003
TR sem x TR com	0,187	0,009

Com relação ao parâmetro do VDF 30 dias após o IAM, identificou-se que os grupos também não eram homogêneos ($P=0,040$), dessa forma, foi utilizada análise de covariância. Quando analisados os resultados em 60 dias observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os grupos sedentário com e sem células ($P<0,001$), sedentário com células e treinado sem células ($P<0,001$) e sedentário e treinado com células ($P<0,001$).

Com relação ao parâmetro do VSF 30 dias após o IAM, identificou-se que os grupos eram homogêneos ($P=0,052$). Após 60 dias observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os grupos sedentários com e sem células ($P=0,008$), sedentário com células e treinado sem células ($P=0,007$) e sedentário e treinado com células ($P=0,002$).

Análise do lactato

Os valores obtidos após a dosagem de lactato são apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Análise do colágeno

Com relação à análise do colágeno na área do IAM, os resultados em 60 dias revelaram que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos treinado com e sem células (Tabela 3 e Figura 2).

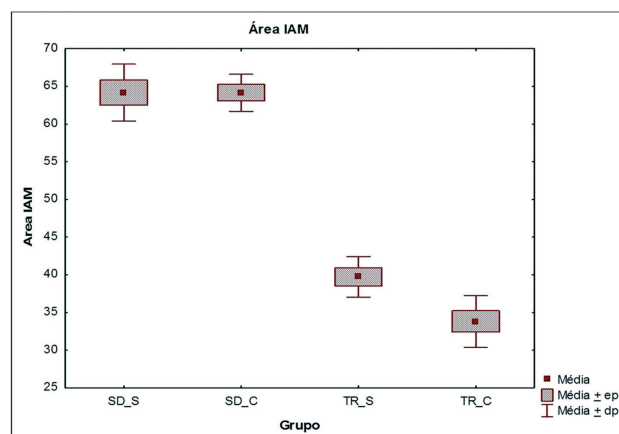


Fig. 2. Colágeno

DISCUSSÃO

A atividade física pode produzir alterações na perfusão miocárdica. O fluxo coronariano é inversamente proporcional à resistência vascular exercida em grande parte pelos vasos situados na microcirculação. O aumento do metabolismo

Tabela 3. Colágeno.

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

IAM = infarto agudo do miocárdio

cardíaco produzido pelo exercício promove a diminuição do tônus vascular (microcirculação), melhorando por consequência a perfusão miocárdica. Essa melhora pode ser considerada expressiva, quando considerados ainda outros componentes envolvidos no processo, como função endotelial, microcirculação, regressão das lesões ateroscleróticas coronarianas, aumento da circulação colateral, redução da viscosidade do sangue e aumento do tempo de perfusão diastólica [12,13].

O transplante de células-tronco mononucleares da medula óssea na cardiomiopatia isquêmica vem sendo realizado com resultados que sugerem melhora funcional do miocárdio, principalmente pelo seu mecanismo de angiogênese no local do transplante [14].

A atividade física também apresenta potencial de vasodilatação regional nas regiões próximas ao IAM, o que possibilita melhora da perfusão do miocárdio infartado e também recuperação global da função do VE. Essas duas opções de tratamento vêm sendo aplicadas em pacientes com insuficiência cardíaca associada. Neste estudo, foi utilizado em um modelo experimental semelhante, pois foram incluídos animais com fibrose estabelecida e disfunção ventricular esquerda grave.

A associação entre as duas terapias demonstrou tendência de melhor controle sobre os fatores deletérios do remodelamento ventricular, uma vez que não houve diferença significativa dos valores de FEVE obtidos antes e 60 dias pós-treinamento. Inclusive em valores absolutos houve aumento.

Com relação à análise funcional no período pré-transplante, os quatro grupos apresentaram os parâmetros da FEVE e VDF do VE com diferença estatística entre si; dessa forma, os parâmetros de FEVE e VDF foram analisados como covariância, na tentativa de homogeneizar os mesmos.

O grupo controle, ou seja, sedentário sem células, apresentou deterioração importante de FEVE após 60 dias do IAM, comprovando o efeito da necrose muscular e, como consequência, o desenvolvimento da insuficiência cardíaca, o que já era de se esperar. Foi identificada pequena queda da FEVE, tanto no grupo sedentário com células como no grupo treinado sem células, sugerindo estabilização da função cardíaca. Essa estabilização pode ser justificada pelo próprio benefício da atividade física no grupo treinado e pela ação das células-tronco mononucleares da medula óssea no grupo sedentário, o que também já foi identificado em outros trabalhos [15].

Com relação ao grupo treinado com células, identificou-se benefício funcional, que pode ser justificado pela ação tanto das células-tronco mononucleares como da atividade física, pelos mecanismos acima justificados. Na comparação entre os grupos sedentário sem célula (controle) com treinado com células, esse resultado foi

evidente. Entretanto, na comparação entre os grupos treinado com e sem células também foi identificado benefício no grupo com células, sugerindo que o benefício das células-tronco mononucleares da medula óssea possa ter sido mais significativo.

Analisando-se apenas os animais que foram submetidos à atividade física, ou seja, os treinados, identificou-se que os animais que receberam as células-tronco mononucleares da medula óssea apresentaram efeito protetor do miocárdio em relação aos animais que não receberam células. É verdade que quando analisado o parâmetro da FEVE intragrupo, mesmo no grupo treinado sem células, houve estabilização da FEVE, pois um decréscimo de 21,49% para 20,71% é considerado irrelevante. Dessa forma, sugere-se o efeito protetor da atividade física nesse modelo, apesar de ter sido identificada maior porcentagem de colágeno, ou seja, fibrose miocárdica, nesse grupo.

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

Com relação ao VDF do VE, os quatro grupos estudados apresentaram aumento dos seus valores após 60 dias do IAM. No grupo controle, em consequência de deterioração da função ventricular pós-IAM, já havia uma previsão que ocorreria remodelamento ventricular. Entretanto, o grupo sedentário com células apresentou dilatação ventricular estatisticamente significativa, o que também foi identificado em um estudo publicado pelo mesmo grupo [14]. Com relação ao grupo treinado com células, apesar da dilatação ventricular identificada, considerou-se que houve estabilização do remodelamento ventricular.

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

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

De acordo com Ferraz et al. [16], a insuficiência cardíaca não deve ser considerada como uma doença simples e pura, mas sim como uma síndrome complexa que envolve: disfunção endotelial, alteração da composição das fibras musculares estriadas esqueléticas periféricas, anormalidades do fluxo sanguíneo e do controle quimiorreflexo ventilatório. Todas essas alterações resultam em menor tolerância ao exercício e em menor capacidade funcional.

Guimarães et al. [17] descreveram os efeitos limitantes ao exercício em pacientes portadores de insuficiência cardíaca, destacando o comportamento de quimiorreceptores centrais e periféricos. Nesses pacientes, ocorre aumento da sensibilidade em quimiorreceptores periféricos, que resulta em maior ativação do sistema nervoso simpático, aumentando a pressão arterial, a ventilação e a resistência vascular periférica. Esse fenômeno é descrito como mecanorreflexo. Além disso, durante a realização de exercícios, pacientes portadores de insuficiência cardíaca apresentam precoce fadiga muscular ventilatória, que resulta em maior demanda de estímulos aferentes ao sistema nervoso central pelas fibras do nervo frênico, ativando o sistema nervoso simpático e desencadeando vasoconstrição periférica e menor tolerância ao exercício. Esse fenômeno foi descrito como metaborreflexo [17,18].

Em decorrência do mecanorreflexo e do metaborreflexo, ocorre uma alteração na composição das fibras musculares periféricas de pacientes portadores de insuficiência cardíaca. De acordo com Schulze et al. [19], pacientes portadores de insuficiência cardíaca sofrem atrofia das fibras tônicas, em decorrência da redução do número de mitocôndrias e mioglobinas presentes nessas fibras por consequência da menor circulação sanguínea permitida pelo aumento da resistência vascular periférica. Assim sendo, as fibras musculares tipo II (fásicas) passam a ser mais ativadas, sendo a glicólise anaeróbia a principal forma de fornecimento de energia para a realização de movimentos, resultando em maior acidose láctica e em menor tolerância ao exercício. Dessa forma, portadores de insuficiência cardíaca tendem a apresentar maior produção de lactato em repouso, quando comparado a pacientes sem disfunção ventricular. Esse comportamento é similar em ratos.

O exercício aeróbio e ou o treinamento muscular ventilatório reduzem os efeitos provocados pelo metaborreflexo e pelo mecanorreflexo. Chiappa et al. [20] demonstraram que indivíduos que fizeram treinamento muscular ventilatório reduziram a resistência vascular periférica, melhorando a perfusão em decorrência de um melhor condicionamento diafragmático e inibição da ação do sistema nervoso simpático. Ferraz et al. demonstraram que pacientes treinados aerobicamente apresentam similar resposta [16-20].

Assim sendo, neste trabalho esperava-se que, com o treinamento aeróbio, os animais apresentassem redução nos valores de lactato de repouso, de acordo com Li et al. [21]. Além disso, com a injeção de células-tronco mononucleares e possível melhora da função ventricular, os efeitos da insuficiência cardíaca poderiam ser minimizados e a composição das fibras musculares periféricas reorganizadas de maneira adequada, permitindo melhor aproveitamento oxidativo como substrato energético [21].

O que chama atenção é que os ratos que receberam células e treinaram aumentaram o lactato de repouso, o que pode ser um sinal de que nesse grupo os efeitos provocados pelo metaborreflexo e pelo mecanorreflexo não foram controlados. A diferença entre os valores de lactato de repouso antes e após 30 dias de atividade física foi significativa com $P= 0,019$, porém é importante ressaltar que em dois grupos houve aumento nos valores de repouso.

Com relação à comparação dos grupos dois a dois no parâmetro do lactato, foram encontradas diferenças significativas quando comparados o grupo sedentário sem células com o grupo treinado com células. Esse resultado sugere uma readaptação ao sistema oxidativo de fontes de energia das fibras musculares periféricas do grupo que recebeu células. Outra diferença significativa foi encontrada entre o grupo sedentário que recebeu células e o que foi treinado com células. Essa diferença foi significativa, uma vez que o valor de lactato de repouso dos ratos sedentários que receberam células reduziu, enquanto que o dos que foram treinados aumentou. Isso demonstra favorável adaptação periférica das fibras dos ratos que receberam células, enquanto que no grupo que recebeu treinamento não houve melhora da perfusão sanguínea periférica.

Ferraz et al. [16] demonstraram que pacientes submetidos a treinamento de baixa intensidade (intensidade equivalente ao limiar anaeróbio) apresentaram melhora da capacidade aeróbia superior àqueles que treinaram em alta intensidade (próximo ao ponto de compensação ventilatório). Isto pode ter acontecido, pois o grupo treinado com células treinou durante o período em uma intensidade acima do limiar de lactato, ou limiar anaeróbio.

Um fator limitante deste estudo foi o fato de não ter sido determinado o ponto de limiar de lactato ou fase estável de exercício. Assim sendo, os ratos podem ter sido treinados constantemente em anaerobiose, o que pode ter resultado em pequena melhora da tolerância ao exercício ou níveis de lactato em repouso.

Por meio da técnica da análise morfométrica foram feitas avaliações quantitativas do colágeno nos corações após 60 dias do IAM. O principal resultado deste estudo com relação à análise do colágeno na área do IAM foi observada uma quantidade significativamente menor no

grupo treinado com células. Acredita-se que os fatores liberados devido ao efeito parácrino das células-tronco possam promover redução da área de fibrose, sugerindo recuperação da função ventricular esquerda, que pode ser corroborada com a melhora da FEVE e a limitação do remodelamento ventricular. Esses dois mecanismos podem também ser explicados pelo potencial angiogênico das células-tronco mononucleares da medula óssea, previamente descritos em outros trabalhos e pelos mecanismos de vasodilatação produzidos pela atividade física [14,15].

Um estudo realizado por Bolli et al. [22] demonstrou, após injeção direta de células-tronco mesenquimais em corações isquêmicos, decréscimo da fibrose, apoptose, além de aumentar a FEVE.

Em outro estudo realizado por Xu et al. [23] demonstrou-se que, em ratos infartados e treinados, após atividade física precoce, a porcentagem de colágeno no grupo treinado foi significativamente maior no grupo sedentário, sugerindo que o treinamento físico precoce pós-IAM reduz a expressão de metaloproteinasas. No presente estudo, esse dado não foi identificado, pois houve maior presença de colágeno no grupo treinado sem células. Entretanto, foi identificada redução da expressão do colágeno quando associado ao transplante das células mononucleares. Esses resultados sugerem que o treinamento físico com auxílio das células-tronco mononucleares da medula óssea melhorou a capacidade física e a função desses animais.

CONCLUSÃO

Com base no estudo realizado podemos concluir que, após 60 dias do IAM, observou-se que o transplante de células mononucleares da medula óssea associado ao exercício físico minimizou os efeitos deletérios do remodelamento ventricular.

REFERÊNCIAS

1. Baena CP, Olandoski M, Luhm KR, Costantini CO, Guarita-Souza LC, Faria-Neto JR. Tendency of mortality in acute myocardial infarction in Curitiba (PR) in the period of 1998 to 2009. *Arq Bras Cardiol.* 2012;98(3):211-7.
2. Mendez GF, Cowie MR. The epidemiological features of heart failure in developing countries: a review of the literature. *Int J Cardiol.* 2001;80(2-3):213-9.
3. Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(15):8801-5.
4. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation.* 2002;106(24):3009-17.
5. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet.* 2003;361(9351):45-6.
6. Queen RM, Weinhold PS, Kirkendall DT, Yu B. Theoretical study of the effect of ball properties on impact force in soccer heading. *Med Sci Sports Exerc.* 2003;35(12):2069-76.
7. COBEA. Princípios éticos na experimentação animal. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/>. Acesso em maio de 2008
8. Carvalho KA, Cunha RC, Vialle EN, Osiecki R, Moreira GH, Simeoni RB, et al. Functional outcome of bone marrow stem cells (CD45+)/CD34(-) after cell therapy in acute spinal cord injury: in exercise training and in sedentary rats. *Transplant Proc.* 2008;40(3):847-9.
9. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;97:77-89.
10. Freimann S, Scheinowitz M, Yekutieli D, Feinberg MS, Eldar M, Kessler-Icekson G. Prior exercise training improves the outcome of acute myocardial infarction in the rat. Heart structure, function, and gene expression. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(6):931-8.
11. Rebuelto M, Ambros L, Montoya L, Bonafine R. Treatment-time-dependent difference of ketamine pharmacological response and toxicity in rats. *Chronobiol Int* 2002;19(5):937-45.
12. McArdle WD. Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara;2003.
13. Negrão CE, Middlekauff HR. Exercise training in heart failure: reduction in angiotensin II, sympathetic nerve activity, and baroreflex control. *J Appl Physiol.* 2008;104(3):577-8.
14. Guarita-Souza LC, Carvalho KAT, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, Furuta M, et al. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2005;20(3):270-8.
15. Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, Furuta M, et al. Cell transplantation: differential effects of myoblasts and mesenchymal stem cells. *Int J Cardiol.* 2006;111(3):423-9.

-
16. Ferraz AS, Yazbel-Junior P. Prescrição do exercício físico para pacientes com insuficiência cardíaca. *Rev Soc Cardiol RS*. 2006;XV:1-13.
 17. Guimarães GV, Belli JFC, Bacal F, Bocchi EA. Behavior of central and peripheral chemoreflexes in heart failure. *Arq Bras Cardiol*. 2011;96(2):161-7.
 18. Li J, Sinoway AN, Gao Z, Maile MD, Pu M, Sinoway LI. Muscle mechanoreflex and metaboreflex responses after myocardial infarction in rats. *Circulation*. 2004;110(19):3049-54.
 19. Schulze PC, Gielen S, Schuler G, Hambrecht R. Chronic heart failure and skeletal muscle catabolism: effects of exercise training. *Int J Cardiol*. 2002;85(1):141-9.
 20. Chiappa GR, Roseguini BT, Vieira PJ, Alves CN, Tavares A, Winkelmann ER, et al. Inspiratory muscle training improves blood flow to resting and exercising limbs in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(17):1663-71.
 21. Li M, Zheng C, Sato T, Kawada T, Sugimachi M, Sunagawa K. Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. *Circulation*. 2004;109(1):120-4.
 22. Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase I trial. *Lancet*. 2011;378(9806):1847-57.
 23. Xu X, Wan W, Ji L, Lao S, Powers AS, Zhao W, et al. Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade limits post-infarct ventricular remodelling in rats. *Cardiovasc Res*. 2008;78(3):523-32.