

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

JULIANA PEREIRA BORGES

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES OPIÓIDES NA CARDIOPROTEÇÃO
INDUZIDA PELO EXERCÍCIO AERÓBIO EM RATOS: ESTUDO *IN VIVO* E *EX*
VIVO

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientadores: Prof. Dr. Marcos Adriano da Rocha Lessa
Prof. Dr. Eduardo Vera Tibiriçá

RIO DE JANEIRO

2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

B732 Borges, Juliana Pereira

Participação dos receptores opióides na cardioproteção induzida pelo exercício aeróbio em ratos: estudos *in vivo* e *ex vivo* / Juliana Pereira Borges. – Rio de Janeiro, 2014.

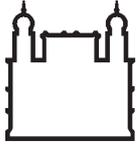
xvii, 87 f.: il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2014

Bibliografia: f. 74-85

1. Cardioproteção. 2. Exercício físico aeróbio. 3. Receptores opióides. 4. Lesão por isquemia e reperfusão. I. Título.

CDD 616.123



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: JULIANA PEREIRA BORGES

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES OPIÓIDES NA CARDIOPROTEÇÃO
INDUZIDA PELO EXERCÍCIO AERÓBIO EM RATOS: ESTUDO *IN VIVO* E *EX
VIVO***

**ORIENTADORES: Prof. Dr. Marcos Adriano da Rocha Lessa
Prof. Dr. Eduardo Vera Tibiriçá**

Aprovada em: 21/03/2014

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado - Presidente

Prof. Dr. Pedro Paulo da Silva Soares

Prof. Dra. Patricia Chakur Brum

Prof. Dr. Vinicius de Frias Carvalho (Suplente)

Prof. Dr. Roger de Moraes (Revisor / Suplente)

Rio de Janeiro, 21 de Março de 2014

Dedico este trabalho ao meu filho,
que apesar de fazer parte da minha vida
há tão pouco tempo, já me trouxe muitas alegrias.

AGRADECIMENTOS

A realização deste projeto seria impossível sem a ajuda de várias pessoas. Portanto, gostaria de deixar aqui algumas poucas, mas sinceras, palavras de agradecimento a todos aqueles que contribuíram, direta e indiretamente para a concretização dessa tese, que marca o término dessa importante etapa da minha vida.

Ao meu orientador Dr. Adriano Lessa, o meu sincero agradecimento pela amizade e todo apoio incondicional que muito elevaram os meus conhecimentos científicos e, sem dúvida, estimularam o meu desejo de querer, sempre, saber mais e fazer melhor.

Ao Dr. Eduardo Tibiriçá, pela co-orientação neste trabalho. Obrigada por me permitir integrar o grupo do Laboratório de Investigação Cardiovascular e também por todo exemplo do que é ser um pesquisador.

Aos estimados professores Patrícia Brum, Pedro Paulo Soares, Marcelo Pelajo, Roger de Moraes e Vinicius Frias que aceitaram gentilmente compor minha banca, mesmo que às vezes vindo de longe, obrigada pelas sugestões e análises significativas às quais irei prontamente atender.

Ao José Hamilton e Anissa Daliry, professores com os quais eu tive o privilégio de poder colaborar e usufruir de seus conhecimentos.

À minha querida amiga de todas as horas, Karine Verdoorn, por toda a amizade que manifestou. Agradeço, de forma especial, a ajuda, o apoio e a preocupação, nos momentos de maior aflição. O seu apoio foi determinante na elaboração desta tese.

À Lorena Paes, Marina Tristão, Laura Lacerda e Leonardo Maciel, que contribuíram de forma significativa para a concretização desse trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, com os quais tive o prazer de aprender e conviver durante algum período nesses quatro anos. À Vanessa Estado, Luciana Garzoni, Felipe Freitas, Alessandro Nascimento, Marcus Vinicius Machado, Lindice Mitié, Nathalie Obadia, Gustavo Masson, Fabiana Gomes, Fabiele Caraméz, e outros que por ventura não tenham sido aqui mencionados, muito obrigada!

Aos meus pais, Zete e Zé, expresse meu profundo agradecimento por todos os ensinamentos nessa vida. Vocês permitiram que muitos dos meus sonhos se tornassem realidade e me ensinaram o que é o amor incondicional.

Ao meu querido esposo e companheiro, Marquinhos, a quem sou muito grata pelo amor, apoio e confiança que ele sempre depositou em mim todos os dias da nossa vida em comum. Obrigada por sempre acreditar em mim, muitas vezes mais do que eu própria em mim.

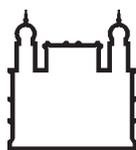
Não poderia deixar de prestar aqui meu agradecimento também à Rita e ao Carlos Henrique, meus ilustres sogrinhos, que me deram muito apoio, principalmente na etapa final, para que eu pudesse finalizar essa tese.

Meu muito obrigada aos órgãos de fomento, CNPQ e FAPERJ. E também ao pessoal da secretaria da Biologia Celular e Molecular, Danielle, Eduardo e Gisele, pela gentileza e ajuda nos detalhes administrativos.

Com todos vocês queridos, divido a alegria desta experiência.

“A verdade é como o Sol.
Ela permite-nos ver tudo, mas
não deixa que a olhemos.”

Victor Hugo



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

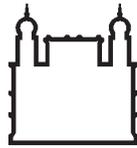
PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES OPIÓIDES NA CARDIOPROTEÇÃO INDUZIDA PELO EXERCÍCIO AERÓBIO EM RATOS: ESTUDO *IN VIVO* E *EX VIVO*

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Juliana Pereira Borges

Sabe-se que o exercício físico agudo reduz a lesão tecidual e a morte celular decorrentes de eventos de isquemia e reperfusão (IR) e infarto agudo do miocárdio. Porém, os mecanismos envolvidos nessa resposta cardioprotetora não são claros. Evidências recentes indicam que os receptores opióides podem estar envolvidos nesse processo. No entanto, além de não se saber especificamente o subtipo de receptor opióide envolvido, são escassos estudos que se debruçaram sobre a relação entre a cardioproteção induzida pelo exercício e opióides. Dessa forma o objetivo da tese foi investigar a participação dos receptores opióides e seus subtipos na cardioproteção induzida pelo exercício físico aeróbio após lesão de IR em ratos. Além disso, buscou-se estabelecer de que forma outros possíveis mecanismos estariam relacionados com a cardioproteção. Para tal, ratos wistar foram submetidos a dois protocolos de isquemia reperfusão: *in vivo* e *ex vivo* (Langendorff). Em ambos os protocolos, animais realizaram 4 sessões de exercício físico (60 min/sessão a 70% do $VO_{2máx}$). Foram medidos os parâmetros hemodinâmicos, área de infarto, densidade capilar estrutural, a expressão proteica de cada subtipo de receptor opióide, e a expressão gênica da capacidade antioxidativa e da proteína de choque térmico 72 (HSP 72). Foi verificado tanto no protocolo *ex vivo* quanto no *in vivo*, que o grupo que se exercitou apresentou menor área de infarto e melhor função hemodinâmica comparado ao grupo controle. Após o tratamento com naloxona, um antagonista não – seletivo para receptores opióides, o efeito cardioprotetor do exercício foi parcialmente bloqueado. Além disso, no protocolo *in vivo*, foi demonstrado que o exercício não alterou a densidade capilar estrutural do ventrículo esquerdo e a expressão gênica de enzimas antioxidantes, medida através de RT-PCR quantitativo. Os níveis de RNAm de HSP 72 estavam reduzidos no grupo exercitado. Foi verificado também que o bloqueio farmacológico dos receptores opióides delta, mas não do kappa e do mu, aboliu o efeito cardioprotetor do exercício físico. No entanto, a expressão proteica dos receptores opióides delta e kappa do grupo exercitado estavam reduzidas em relação ao grupo controle. Em conclusão, nossos resultados sugerem que mesmo poucas sessões de exercício físico podem proporcionar cardioproteção contra lesões por IR, que não está relacionada a angiogênese, aumento na expressão gênica miocárdica de HSP 72 e enzimas antioxidantes, mas sim ao sistema de opióides, e mais especificamente aos receptores delta.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

OPIOID RECEPTORS INVOLVEMENT IN EXERCISE-INDUCED CARDIOPROTECTION IN RATS:

AN *IN VIVO* AND *EX VIVO* STUDY

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Juliana Pereira Borges

It is known that acute exercise reduces tissue damage and cell death resulting from events of ischemia and reperfusion (IR) and acute myocardial infarction. However, the mechanisms involved in this cardioprotective effect are unclear. Recent evidences indicate that opioid receptors may be involved in this response. Nevertheless, besides not knowing specifically what subtype of opioid receptor are associated to cardioprotection, there are few studies which have examined the relationship between exercise-induced cardioprotection and opioids. So, the objective of the thesis was to investigate the involvement of opioid receptors and its subtypes in exercise-induced cardioprotection after IR injury in rats. Furthermore, we aimed to establish how other possible mechanisms would be related to cardioprotection. To do so, wistar rats were submitted to two different protocols of IR: *in vivo* and *ex vivo* (Langendorff). In both, animals performed 4 sessions of aerobic exercise (60 min/session at 70% of VO_{2max}). Hemodynamics, infarct size, structural capillary density, protein expression of each opioid receptor subtype and gene expression of antioxidant capacity and heat shock protein 72 (HSP 72) were measured. It was observed in both *in vivo* and *ex vivo* protocols that the exercised group presented significant smaller infarct size and greater hemodynamic function compared to control group. After the treatment with naloxone, a non-selective opioid receptor antagonist, the cardioprotective effect of exercise was partially annulled. Furthermore, *in vivo* protocol showed that exercise did not alter left ventricle structural capillary density and gene expression of antioxidant enzymes, measured through quantitative RT-PCR. The HSP 72 mRNA levels were reduced in exercised group. It was also shown that pharmacological blockade of delta opioid receptors, but not kappa and mu, abolished the exercise-induced cardioprotection. However, protein expression of delta and kappa opioid receptors in exercised group was significant reduced compared to control group. In conclusion, our results suggest that even short-term aerobic exercise promotes cardioprotection against IR injury, which is not associated to angiogenesis, increased myocardial gene expression of HSP 72 and antioxidant enzymes, but to opioid system, and more specifically to delta opioid receptors.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: “Primers” utilizados para análise de expressão gênica através de RT-CR.....	40
Tabela 4.1: Variáveis obtidas nos testes para determinação da capacidade máxima em todos os grupos experimentais.....	47
Tabela 4.2: Função cardíaca antes e após isquemia-reperfusão em Langendorff nos grupos experimentais.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1:	Ilustração da circulação arterial coronariana.....	6
Figura 1.2:	Níveis de lesão do miocárdio.....	7
Figura 1.3:	Alterações metabólicas e bioquímicas ocorridas no miocárdio em resposta à isquemia e reperfusão.....	10
Figura 1.4:	Ilustração do leito vascular arterial e capilares coronários.....	18
Figura 1.5:	Diagrama esquemático de possível via de sinalização envolvida na cardioproteção induzida pelos canais K_{ATP} e opióides.....	22
Figura 3.1:	Teste incremental máximo realizado para determinação do $VO_{2máx}$ em esteira acoplada à analisador de gases.....	30
Figura 3.2:	Diagrama organizacional do protocolo de exercício.....	31
Figura 3.3:	Divisão dos grupos experimentais no modelo de isquemia reperfusão <i>ex vivo</i>	31
Figura 3.4:	Representação esquemática da montagem de Langendorff mostrando solução de Krebs sendo perfundida no coração através da bomba peristáltica fixada a 10 ml/min, após aquecimento a 37 °C.....	32
Figura 3.5:	Ilustração da determinação da pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo (PDVE), através da média da pressão máxima (P máx) e pressão mínima (P min) medidas no ventrículo esquerdo.....	33
Figura 3.6:	Figuras representativas da determinação da área do infarto realizada através do “Image J”, após cortes terem sido corados com TTC.....	34
Figura 3.7:	Divisão dos grupos experimentais no modelo de isquemia reperfusão <i>in vivo</i>	35
Figura 3.8:	Representação esquemática da lesão tecidual decorrente dos efeitos da ligadura coronariana reversível.....	36
Figura 4.1:	Identificação das diferentes regiões de um corte de ventrículo esquerdo pela técnica de azul de Evans e TTC.....	45
Figura 4.2:	Percentual da pressão desenvolvida durante a lesão por isquemia e reperfusão em Langendorff dos grupos exercitado (Exe; n = 4), exercitado submetido a bloqueio não – seletivo do receptores opióides (Exe + N; n = 4) e controle (CT; n = 4).....	48
Figura 4.3:	Área de infarto após lesão por isquemia e reperfusão no Langendorff nos grupos controle (CT; n = 4), exercitado (Exe; n = 4) e exercitado submetido a bloqueio não - seletivo dos receptores opióides (Exe + N; n = 4).....	50

Figura 4.4: Figuras representativas de cortes realizados no coração após coloração com TTC do grupo controle (A), exercitado submetido a bloqueio não – seletivo dos receptores opióides (B) e exercitado (C).....	51
Figura 4.5: Figuras representativas de cortes realizados no coração após coloração com TTC do grupo controle (A), exercitado submetido a bloqueio não – seletivo dos receptores opióides (B) e exercitado (C).....	53
Figura 4.6: Área de infarto observada após lesão por isquemia e reperfusão no modelo <i>in vivo</i> nos grupos controle (CT; n = 10), exercitado (Exe; n = 10), exercitado submetido a bloqueio não – seletivo dos receptores opióides (Exe + N; n = 10) e controle submetido a bloqueio não – seletivo dos receptores opióides (CT + N; n = 10).....	54
Figura 4.7: Efeito do protocolo de exercício físico utilizado sobre a densidade capilar estrutural no ventrículo esquerdo no grupo controle (CT; n = 5) e exercitado (Exe; n = 5).....	55
Figura 4.8: Imagem representativa de fotomicrografia adquirida utilizando microscopia de fluorescência para avaliação histológica de densidade capilar estrutural com lectina <i>Griffonia simplicifolia</i> acoplada à FITC-conjugado.....	56
Figura 4.9: Expressão do VEGF no ventrículo esquerdo dos grupos controle (CT; n = 5) e exercitados (Exe; n = 5). Immunoblots representativos dos grupos CT e Exe para VEGF e Actina (A). Os gráficos representam a expressão do VEGF normalizados por Actina (B). u.a. unidades arbitrárias.....	57
Figura 4.10: Resultados dos níveis de expressão do RNAm normalizados pela β -actina de enzimas antioxidantes (Cu,ZnSOD, Catalase, EcSOD, MnSOD) e HSP 72, encontrados no ventrículo esquerdo, nos grupos Exe (n = 3) e CT (n = 5).....	58
Figura 4.11: Área de infarto após lesão por isquemia e reperfusão no modelo <i>in vivo</i> nos grupos controle (CT; n = 10), exercitado (Exe; n = 10), exercitado submetido a bloqueio seletivo de receptores kappa (Exe + K; n = 5), exercitado submetido a bloqueio seletivo de receptores mu (Exe + M; n = 5) e exercitado submetido a bloqueio seletivo de receptores delta (Exe + D; n = 5).....	59
Figura 4.12: Expressão dos subtipos de receptores opióides após lesão por isquemia e reperfusão. Immunoblots dos grupos controle (CT; n = 5) e exercitados (Exe; n = 3) para receptor opióide kappa (A) e delta (C), sendo as bandas em rosa coradas com “Ponceau”. Os gráficos representam a expressão dos receptores opióides kappa (B) e delta (D) normalizados por “Ponceau”.....	61

Figura 4.13: Expressão dos subtipos de receptores opióides sem lesão por isquemia e reperfusão. Immunoblots dos grupos controle (CT; n = 4) e exercitados (Exe; n = 5) para receptor opióide kappa (A) e delta (C), sendo as bandas em rosa coradas com “Ponceau”. Os gráficos representam a expressão dos receptores opióides kappa (B) e delta (D) normalizados por “Ponceau”.....62

LISTA DE ABREVIACOES

ANOVA.....	Análise de Variância
ATP.....	Adenosina Trifosfato
ADP.....	Adenosina Difosfato
BSA.....	Albumina Bovina Sérica
CAT.....	Catalase
cDNA.....	DNA Complementar
CECAL.....	Centro de Criao de Animais de Laboratório
CT.....	Limiar do Ciclo
CTE.....	Cadeia de Transporte de Elétrons
Cu,ZnSOD	Superóxido Dismutase Cobre e Zinco
DAC.....	Doença Coronariana
DADLE.....	D-Ala2-d-Leu5 encefalina
DCE.....	Densidade Capilar Estrutural
DNA.....	cido Desoxirribonucleico
dP/dt máx.....	Velocidade Máxima de Aumento da Pressão no Ventrículo Esquerdo
dP/dt min.....	Velocidade Máxima de Queda da Pressão no Ventrículo Esquerdo
ECG.....	Eletrocardiograma
EcSOD.....	Superóxido Dismutase Endotelial
EROs.....	Espécies Reativas de Oxignio
FC.....	Frequência Cardíaca
FITC.....	Fluoresceína-isotiocianato
GPX.....	Glutathione Peroxidase
GR.....	Glutathione Redutase
HRF.....	Fator Indutor de Hibernao
HSP.....	Proteína de Choque Térmico
IAM.....	Infarto Agudo do Miocárdio
IR.....	Isquemia e Reperfusão
MAPK.....	Proteína Quinase Ativada por Mitgenos
Mito.....	Mitocondrial
MnSOD.....	Superóxido Dismutase Manganês
MPTP.....	Poros de Transio de Permeabilidade Mitocondrial
NADH.....	Dinucleotídeo de Adenina Nicotinamida
NADPH.....	Dinucleotídeo de Adenina Nicotinamida Fosfato

NCX.....	Trocador de Sódio e Cálcio
NHE.....	Trocador de Sódio e Hidrogênio
NO.....	Óxido Nítrico
PA.....	Pressão Arterial
PAD.....	Pressão Arterial Média
PAM.....	Pressão Arterial Média
PAS.....	Pressão Arterial Sistólica
PCR.....	Reação de Cadeia da Polimerase
PDF.....	Pressão Diastólica Final
PDVE.....	Pressão Desenvolvida do Ventrículo Esquerdo
PE.....	Tubo de Polietileno
PIM.....	Pré-Condicionamento Isquêmico do Miocárdio
PKC.....	Proteína Quinase C
P máx.....	Pressão Máxima
P mín.....	Pressão Mínima
PMSF.....	Fenilmetilsulfonil Fluoridro
RNA.....	Ácido Ribonucleico
RNA _m	Ácido Ribonucleico Mensageiro
RT-PCR.....	Reação de Cadeia da Polimerase em Tempo Real
Sarco.....	Sarcolemal
SERCA.....	Bomba de Cálcio do Retículo Sarcoplasmático
SOD.....	Superóxido Dismutase
TIM.....	Teste Incremental Máximo
TTC.....	Cloreto de Trifeniltetrazolium
VE.....	Ventrículo Esquerdo
VEGF.....	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
VO ₂ máx.....	Consumo Máximo de Oxigênio

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
1 REVISÃO DE LITERATURA	04
1.1 Exercício e Cardioproteção	04
1.2 Doença Isquêmica do Miocárdio	05
1.3 Circulação Arterial Coronariana e Metabolismo do Coração	06
1.4 Níveis de Lesão do Miocárdio	07
1.5 Fisiopatologia da Lesão por Isquemia e Reperfusão do Miocárdio	08
1.6 Estresse Oxidativo	11
1.7 Tipos de Cardioproteção Contra Lesões por Isquemia e Reperfusão	13
1.8 Pré-Condicionamento do Miocárdio por Exercício	14
1.9 Mecanismos Envolvidos no Pré-Condicionamento do Miocárdio por Exercício	15
1.9.1 <u>Proteínas de Choque Térmico</u>	16
1.9.2 <u>Remodelamento Vascular</u>	17
1.9.3 <u>Antioxidantes</u>	19
1.9.4 <u>Canais de Potássio Dependentes de ATP</u>	20
1.10 Sistema Opióide e Cardioproteção	22
1.11 Tipos de Receptores Opióides e Cardioproteção	23
1.12 Opióides, Exercício e Cardioproteção	25
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos Específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Procedimentos Éticos	29
3.2 Animais	29
3.3 Determinação da Capacidade Máxima de Exercício	29
3.4 Sessões de Exercício Físico	30
3.5 Verificação do Efeito Cardioprotetor do Exercício e a Participação do Sistema Opióide em Modelo de IR <i>ex vivo</i>	31
3.5.1 <u>Protocolo Experimental</u>	31
3.5.2 <u>Preparação do Coração Isolado</u>	32
3.5.3 <u>Medidas Hemodinâmicas</u>	32
3.5.4 <u>Determinação da Área de Infarto</u>	33
3.6 Verificação do Efeito Cardioprotetor do Exercício e a Participação do Sistema Opióide em Modelo de IR <i>in vivo</i>	34
3.6.1 <u>Protocolo Experimental</u>	34
3.6.2 <u>Procedimentos Cirúrgicos</u>	35
3.6.3 <u>Medidas Hemodinâmicas</u>	37
3.6.4 <u>Determinação da Área de Infarto</u>	37
3.7 Verificação da Influência da Participação de Outros Potenciais Mecanismos na Cardioproteção Induzida Pelo Exercício	37

3.7.1	<u>Análise Histológica do Ventrículo Esquerdo</u>	37
3.7.2	<u>Western Blotting Para Expressão do VEGF</u>	38
3.7.3	<u>RT-PCR Quantitativo</u>	39
3.8	Investigação do Envolvimento de Cada Tipo de Receptor Opióide na Cardioproteção Induzida Pelo Exercício	40
3.8.1	<u>Protocolo Experimental Para Bloqueio Farmacológico</u>	40
3.8.2	<u>Western Blotting Para Expressão dos Subtipos de Receptores Opióides</u>	41
3.9	Drogas	42
3.10	Representação Esquemática	42
3.11	Análise Estatística	44
4.	RESULTADOS	45
4.1	Padrões Histológicos	45
4.2	Capacidade Máxima de Exercício	46
4.3	Efeito Cardioprotetor do Exercício e a Participação do Sistema Opióide em Modelo de IR <i>ex vivo</i> ...	48
4.3.1	<u>Medidas Hemodinâmicas</u>	48
4.3.2	<u>Determinação da Área de Infarto</u>	50
4.4	Efeito Cardioprotetor do Exercício e a Participação do Sistema Opióide em Modelo de IR <i>in vivo</i>	52
4.4.1	<u>Medidas Hemodinâmicas</u>	52
4.4.2	<u>Determinação da Área de Infarto</u>	54
4.5	Outros Potenciais Mecanismos na Cardioproteção Induzida Pelo Exercício.....	55
4.5.1	<u>Densidade Capilar Estrutural</u>	55
4.5.2	<u>Expressão do VEGF</u>	56
4.5.3	<u>Expressão Gênica da Capacidade Antioxidativa e da HSP 72</u>	57
4.6	Envolvimento de Cada Tipo de Receptor Opióide na Cardioproteção Induzida Pelo Exercício	59
4.6.1	<u>Bloqueio Farmacológico</u>	59
4.6.2	<u>Expressão dos Subtipos de Receptores Opióides</u>	60
5.	DISCUSSÃO	63
6.	CONCLUSÃO	71
7.	TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS	72
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

INTRODUÇÃO

Dados epidemiológicos recentes apontam que a taxa de mortalidade decorrente de doenças cardiovasculares reduziu significativamente na última década [1, 2]. No entanto, as doenças cardiovasculares ainda representam um grave problema de saúde pública, sendo a principal causa de mortalidade na população mundial e correspondendo, em média, a cerca de 30% das causas de óbito. Dentre elas, a doença coronariana (DAC) tem destaque especial, uma vez que vem atingindo um número cada vez maior de pacientes adultos em plena idade produtiva. Anualmente nos Estados Unidos, aproximadamente 1 milhão de pessoas sofrem um infarto agudo do miocárdio (IAM) decorrente da DAC, sendo que desses, quase 400 mil chegam a óbito. Estima-se que a cada 34 segundos, um americano sofrerá um evento coronário, e em média, a cada 1 minuto e 23 segundos, uma pessoa irá morrer vítima de IAM [2].

No Brasil, o Ministério da Saúde relatou que em 2009, em média 960 mil óbitos ocorreram devido a doenças cardiovasculares em indivíduos com mais de 30 anos, sendo 95.500 devido a IAM [1]. Apesar de não se conhecer o número exato de IAM que ocorre anualmente no Brasil, estima-se que seja entre 300 a 400 mil casos, e que a cada 5 a 7 eventos ocorre 1 óbito. Esses dados conferem a esta doença elevada taxa de incidência e mortalidade, apesar dos inúmeros avanços terapêuticos obtidos na última década [3].

A DAC se caracteriza pela isquemia do miocárdio, ou seja, redução ou interrupção do fluxo sanguíneo arterial coronariano para uma determinada região do músculo cardíaco. Esse processo é resultado do acometimento das coronárias por um processo inflamatório crônico chamado aterosclerose, que leva à obstrução progressiva da luz do vaso. Já se sabe que a isquemia é capaz de causar lesões que variam de pequenos e reversíveis danos ao miocárdio até lesão extensa culminando em morte do cardiomiócito [4]. O nível da lesão miocárdica que ocorre com a isquemia é determinado pela sua extensão e seu tempo de duração [4, 5]:

Como a reversibilidade e a extensão dos efeitos deletérios da isquemia relacionam-se diretamente com a sua duração, o objetivo terapêutico principal é restabelecer a reperfusão o mais rápido possível [6]. No entanto, apesar da reperfusão, através de terapia trombolítica ou intervenção coronária [7], ser considerado o tratamento de escolha para redução da área de infarto, esse processo pode resultar em inúmeros danos, desde alterações funcionais e estruturais até morte celular, que são conjuntamente conhecidos como lesão por reperfusão [6, 7].

Tendo em vista o grave problema clínico exposto, o desenvolvimento de abordagens terapêuticas que visem o tratamento das lesões por isquemia e reperfusão (IR), deve ser objetivo constante do sistema de saúde e da pesquisa biomédica.

Nesse sentido, vários estudos epidemiológicos dão suporte à ideia de que o exercício físico regular reduz o risco de mortalidade por doenças cardiovasculares [8-11]. Indivíduos fisicamente ativos apresentam menor incidência de IAM e maior taxa de sobrevivência após um evento de IAM comparado a sedentários [8, 12]. Inúmeros estudos corroboraram o conceito de que o exercício induz cardioproteção [4, 13-18], sendo o exercício associado a uma redução de em média 20 a 30% no risco de DAC [8].

Além do efeito cardioprotetor do exercício se dar em função do seu papel de reduzir os fatores de risco cardiovasculares, tais como hipertensão, diabetes mellitus, obesidade e dislipidemia [12, 19], ele também é capaz de promover cardioproteção contra IR através de um efeito direto no miocárdio [4, 12, 14, 20]. McElroy et al [21], por exemplo, demonstraram que a prática regular de exercícios físicos reduz o tamanho da área do infarto em 30% em ratos submetidos a oclusão da artéria coronária.

Embora já esteja bem descrito esse efeito cardioprotetor do exercício, o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda é motivo de debate [12, 20, 22]. Alguns dos mecanismos propostos envolvem: (a) aumento na produção de proteínas de choque térmico (HSP) [4, 20, 22]; (b) remodelamento vascular, associado a aumento no número e diâmetro de capilares e artérias coronárias [4, 20]; (c) aumento na capacidade antioxidativa cardíaca, associado à redução na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas mitocôndrias do miocárdio [4, 16, 20, 22]; e (d) melhora na função dos canais de potássio dependentes de adenosina trifosfato (ATP) presentes no sarcolema e mitocôndria (canais K_{ATP} sarco / mito) [20, 22].

Em adição, achados recentes sugerem que opióides endógenos também podem estar envolvidos na cardioproteção induzida pelo exercício [14, 19]. Os avanços obtidos na última década em relação à farmacologia dos agentes opióides, principalmente a identificação, clonagem e a expressão de seus diferentes subtipos de receptores, permitiram uma melhor caracterização desse sistema, mudando de maneira significativa a percepção a respeito de suas funções. Classicamente relacionado aos efeitos analgésicos de origem central, principalmente em função da morfina, o sistema opióide e as drogas que nele atuam estão ganhando destaque por sua capacidade de induzir cardioproteção [23].

Nesse contexto, fortes evidências indicam que os opióides endógenos estão envolvidos na cardioproteção induzida pelo pré-condicionamento isquêmico do miocárdio (PIM) [19, 23-27], fenômeno no qual breves períodos de isquemia seguidos de reperfusão são capazes de tornar o miocárdio mais resistente contra um evento isquêmico prolongado subsequente [28].

Curiosamente, apesar do importante papel do sistema opióide no PIM, pouco se sabe sobre seu envolvimento no efeito cardioprotetor do exercício. Em adição, o subtipo específico de receptor opióide supostamente responsável por esse efeito ainda não foi identificado.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi elucidar qual subtipo de receptor opióide está associado a cardioproteção induzida pelo exercício, e sua importância relativa comparado a outros supostos mecanismos, tais como aumento na produção de HSP, capacidade antioxidativa cardíaca e angiogênese.

1 Revisão de Literatura

1.1 Exercício e Cardioproteção

Vários estudos epidemiológicos suportam a ideia de que o exercício físico regular reduz o risco de mortalidade por doenças cardiovasculares, independente da modificação em outros hábitos diários [9, 10, 29]. Sendo assim, é tido como um componente importante para um estilo de vida saudável. Astrand [30], em estudo de revisão, indicou que os benefícios advindos da prática de atividade física já estão bem elucidados na literatura, incluindo desde melhora na qualidade de vida à redução na morbidade e mortalidade. De fato, indivíduos fisicamente ativos apresentam menor incidência a IAM e maior taxa de sobrevivência após evento cardíaco comparado a sedentários [8]. Nesse sentido, Berlin et al [8] demonstraram que o exercício físico está associado a uma redução de em média 20 a 30% no risco de DAC [9]. Tal resultado foi confirmado anos após por estudo de meta-análise de Nocon et al. [31] que contou com 33 estudos somando 883.372 indivíduos e reportou uma redução significativa de 35% no risco cardiovascular para os participantes fisicamente ativos.

Estudos mecanísticos sugeriram que essa proteção é multifacetária, e está associada desde alterações moleculares até modificações em fatores de risco para DAC. Dessa forma, Quindry et al [22] recentemente classificaram a cardioproteção induzida pelo exercício em quatro grandes categorias:

- 1) modificação de fatores de risco para doenças cardiovasculares [30, 32], tais como hipertensão, diabetes mellitus, obesidade e dislipidemia [4, 12, 30];
- 2) remodelamento do ventrículo esquerdo (VE), em função da demanda hemodinâmica que o exercício regular induz [22];
- 3) reabilitação pós-evento cardíaco, observada pela redução da propensão e severidade de novos eventos isquêmicos em pacientes com doença cardiovascular [22];
- 4) pré-condicionamento cardíaco, caracterizado por um fenótipo cardíaco resistente a lesões miocárdicas após a realização de exercício [4, 5, 12-14, 33].

Dentre as listadas, o pré-condicionamento cardíaco foi o tipo de proteção menos estudada. Apesar de evidências experimentais recentes já terem demonstrado que o fenótipo cardíaco adquirido após o exercício ocorrer devido a adaptações bioquímicas específicas do miocárdio que ocorrem independentemente de alterações musculares e no fluxo sanguíneo, o mecanismo específico envolvido no pré-condicionamento cardíaco induzido pelo exercício ainda é alvo de discussão [4, 5, 12, 13]. No entanto, antes de aprofundarmos a discussão

acerca desses possíveis mecanismos, é necessário entender melhor como as lesões do miocárdio são causadas.

1.2 Doença Isquêmica do Miocárdio

A doença isquêmica do miocárdio resulta da obstrução progressiva da luz das artérias coronárias, reduzindo a oferta de oxigênio e nutrientes para as células do miocárdio e do sistema de condução. A grande responsável por essa obstrução é a aterosclerose, doença que compromete as artérias musculares de grande e médio porte, sendo incluídas nesse grupo as coronárias [34].

A aterosclerose, caracterizada pela formação de placa de ateroma que leva à estenose progressiva da luz do vaso, é uma doença inflamatória crônica e progressiva, que se desenvolve a partir da disfunção do endotélio [6, 12, 34, 35]. As causas da disfunção endotelial por sua vez, estão principalmente associadas à concentração sanguínea elevada de lipoproteína de baixa densidade, EROs, hipertensão e diabetes [34].

Podemos classificar a placa de ateroma em três etapas distintas: inicial, intermediária e complicada. A inicial é caracterizada pelo acúmulo gradual de macrófagos preenchidos de lipídios oxidados (células espumosas). Enquanto a lesão intermediária se desenvolve pela perpetuação da resposta inflamatória que estimula a migração, proliferação e o acúmulo de células musculares lisas. Com a manutenção do processo inflamatório, há aumento do número de monócitos e linfócitos provenientes do sangue que se acumulam e se multiplicam dentro da lesão. A ativação dessas células leva à liberação de enzimas hidrolíticas, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, que induzem o agravamento da lesão e, eventualmente, provocam necrose focal [34]. Já a lesão complicada se desenvolve por ciclos repetidos de migração, acúmulo e proliferação de células mononucleares e de células musculares lisas que formam um tecido fibroso levando ao aumento e a reestruturação da lesão. A partir dessa fase, a artéria é incapaz de se dilatar de maneira compensatória, levando ao estreitamento do vaso pela protusão da placa para sua luz. Nas placas mais extensas, podem haver rupturas, causando hemorragia, ulceração, formação de trombos e a liberação de êmbolos, e, uma vez ocorrendo nas coronárias, pode levar a graves consequências para o coração [34].

1.3 Circulação Arterial Coronariana e Metabolismo do Coração

Todo o suprimento sanguíneo para o miocárdio é proveniente das artérias coronárias direita e esquerda [36]. Os óstios das coronárias se localizam na raiz da aorta e constituem seus primeiros ramos. De forma geral, nos mamíferos, a coronária direita nutre o ventrículo e átrio direito, assim como a coronária esquerda o ventrículo e átrio esquerdo. A coronária esquerda divide-se ainda em dois ramos principais: a circunflexa que irriga o átrio esquerdo e a maior parte do VE e a descendente anterior que desce pelo sulco interventricular até a ponta do coração, e cujos ramos nutrem o septo interventricular e as porções vizinhas ao septo, tanto do VE como do ventrículo direito [36, 37] (Figura 1.1).

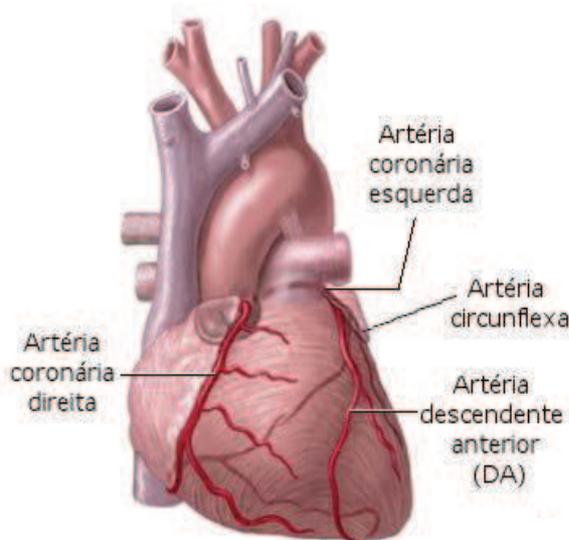


Figura 1.1: Ilustração da circulação arterial coronariana. Adaptado de Lynch [38].

Apesar de representar apenas menos de 0,5% do peso corporal total, o coração recebe, em média, 5% do débito cardíaco em repouso. Essa discrepância reflete não apenas o alto metabolismo de suas células, mas também a contínua necessidade de disponibilizar nutrientes [39]. O ácido graxo livre é a principal fonte de combustível, contribuindo com 60 a 80% de toda energia. A fonte remanescente necessária é advinda do lactato e glicose. No entanto, assim como no músculo, o combustível usado no coração é dependente da disponibilidade desses nutrientes. Dessa forma, em condições especiais como a isquemia, jejum prolongado ou exercício extenuante, a relação na utilização de nutrientes pode ser modificada. Assim, pode-se dizer que o coração se trata de um órgão extremamente versátil na utilização de substratos energéticos [39, 40].

Sendo o coração um órgão eminentemente aeróbio, ele utiliza a fosforilação oxidativa para gerar o ATP necessário e atender suas demandas. Em média, dois terços de todo ATP gerado são utilizados na contração muscular, enquanto o restante é usado para a atividade de bombas ativas transportadoras de íons, responsáveis por manter o equilíbrio iônico cardíaco. Dentre elas, destaca-se a bomba sarcolemal de sódio/potássio ATPase (Na^+/K^+) e a bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático, também chamada comumente de SERCA (“Sarco Endoplasmatic Reticulum Calcium ATPase”) [40].

1.4 Níveis de Lesão do Miocárdio

Dependendo da extensão da isquemia causada pela obstrução coronariana e seu tempo de duração, podemos distinguir três diferentes níveis de lesão do miocárdio [4, 5] (Figura 1.2):

- Reperusão após 1 a 5 minutos de isquemia, que pode resultar em taquicardia ventricular ou fibrilação sem morte celular ou déficit na contratilidade ventricular;
- Reperusão após 5 a 20 minutos de isquemia, quando, além das arritmias, ocorre déficit reversível na contratilidade do miocárdio sem associação a morte celular. O processo patológico que ocorre nesse nível parece ocorrer em função da formação de EROs e alteração no funcionamento de diversos canais de íons, causando perda da homeostase do cálcio [12, 41];
- Reperusão após 20 minutos de isquemia, sendo que nessas circunstâncias além da arritmia, se iniciam as alterações irreversíveis, que causam morte celular, por necrose ou apoptose das células cardíacas (cardiomiócitos). Dessa forma, o IAM, caracterizado por cessação ou drástica redução da oferta de oxigênio em determinada região do coração, só ocorre quando a perfusão do miocárdio é prejudicada por períodos superiores a 20 minutos [4, 5, 41].

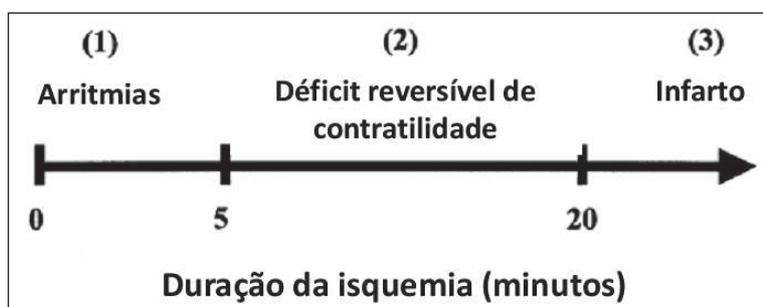


Figura 1.2: Níveis de lesão do miocárdio.

Como dito, a morte celular característica do terceiro nível, pode ocorrer de acordo com dois mecanismos distintos: apoptose ou necrose. A apoptose, chamada de morte celular programada, é considerada um processo celular fundamental no crescimento e desenvolvimento celular. Durante esse processo, ocorre encolhimento da célula, fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA), condensação do núcleo e a formação de várias pequenas vesículas com constituintes celulares para fagocitose. Apesar de fundamental para a homeostase celular, o excesso de apoptose durante a isquemia, é deletério para a viabilidade do tecido e a função cardíaca em geral [42]. Já a necrose, caracterizada por inchaço da célula e suas organelas, está associada à perda da integridade da membrana plasmática. Pode ser definida como morte celular desorganizada, resultante da falta de oxigênio e perda da habilidade de produzir ATP. A morte celular decorrente de lesão por isquemia ocorre como resultado de múltiplas causas, mais notadamente associadas à necrose do que apoptose [42].

Como a reversibilidade e a extensão dos efeitos deletérios da isquemia relacionam-se diretamente com a sua duração, o objetivo terapêutico principal é restabelecer a reperfusão sanguínea o mais rápido possível [6]. No entanto, apesar da reperfusão, através de terapia trombolítica ou intervenção coronária [7], ser considerado o tratamento de escolha para reduzir a área de infarto, o processo por si só pode resultar em inúmeros danos, incluindo morte celular [6, 7]. Dessa forma, é possível distinguir dois tipos de lesão, uma por isquemia e outra por reperfusão, que apesar de distintas, podem ser consideradas uma só patologia, devido ao fato de que a reperfusão deve ocorrer para a sobrevivência do tecido. A próxima sessão será dedicada a revisar conjuntamente a lesão por IR e sua fisiopatologia.

1.5 Fisiopatologia da Lesão por Isquemia e Reperfusão do Miocárdio

Muito se têm estudado nas últimas décadas no intuito de definir a patogênese da lesão por IR. Há grande complexidade na sucessão de eventos relacionados à isquemia, caracterizada por uma série de alterações metabólicas e bioquímicas abruptas no miocárdio que levam ao dano cardíaco [43]. Apesar dessa complexidade, os fatores principais responsáveis pela morte celular são bem conhecidos e serão aqui descritos (figura 1.3).

Durante a isquemia, o suprimento de oxigênio destinado à mitocôndria se cessa, interrompendo o ciclo de Krebs, e fazendo com que quase nenhuma energia seja disponível a partir da fosforilação oxidativa. Portanto, no intuito de suprir a demanda energética do miocárdio, o ATP celular é gerado pela glicólise [40]. No entanto, essa alteração do

metabolismo celular de oxidativo para glicolítico é acompanhada por um aumento nos níveis de lactato citosólico e redução do pH intracelular. Isso ocorre de maneira que após 30 minutos de isquemia, a concentração iônica de hidrogênio no citosol aumenta de forma tão significativa que o pH celular pode chegar a 5,5-6,0 [39]. A fim de compensar o baixo pH, ocorre acúmulo intracelular de água, causando inchaço ou edema celular (“cell swelling”) [6]. Em conjunto, essas alterações ativam um transportador de íons de membrana independente de ATP, chamado trocador de sódio/hidrogênio (NHE, “Na⁺/H⁺ exchanger”). O NHE, cuja função é regular o pH e volume intracelular, promove simultaneamente efluxo de íons H⁺ e influxo de Na⁺ na célula. Em função do aumento da concentração de Na⁺ no citosol, ocorre ativação reversa do trocador de sódio/cálcio (NCX, “Na⁺/Ca²⁺ exchanger”), que passa a excluir Na⁺ em troca da entrada de Ca²⁺ na célula [7, 40].

Em paralelo, a redução nos níveis de ATP interrompe a atividade de bombas ativas importantes na homeostase iônica, como as já descritas Na⁺/K⁺ ATPase e SERCA. A função da Na⁺/K⁺ ATPase é excluir o Na⁺ e permitir a entrada do K⁺ no intuito de manter o potencial elétrico de repouso da célula, enquanto a SERCA é responsável por “recapturar” o Ca²⁺ liberado no citosol de volta para o retículo sarcoplasmático após a contração muscular. Portanto, a inatividade dessas bombas resulta em sobrecarga adicional de Na⁺ e Ca²⁺, o que inviabiliza a repolarização celular e culmina em disfunção contrátil [40].

Além disso, níveis elevados de Ca²⁺ no citosol prejudicam os cardiomiócitos devido a ativação de enzimas prejudiciais à célula, tais como:

- Fosfolipases, que causam dano à membrana celular, com consequente peroxidação lipídica;
- Proteases (principalmente a calpaína), que causam déficit no transporte de cálcio realizado pelo retículo sarcoplasmático e disfunção de proteínas contráteis;
- Endonucleases, enzimas de restrição que rompem a estrutura do DNA e do citoesqueleto causando perda da função celular;
- ATPases, que consomem os ATPs restantes.

Os efeitos deletérios dessas enzimas estão associados à produção de EROs e à ruptura dos lisossomas, que liberam seu conteúdo de enzimas digestivas no citoplasma. Isso faz com que as organelas e membrana celular sejam degradadas, com consequente extravasamento celular, causando inflamação e por fim, necrose celular.

Durante a reperfusão os danos da isquemia são exacerbados, pois a restauração do fluxo de oxigênio e consequentemente da cadeia de transporte de elétrons (CTE) gera uma descarga de EROs na mitocôndria [20]. O quadro de IR promove produção de EROs por diferentes vias, incluindo a mitocôndria, xantina oxidase e dinucleotídeo de adenina nicotinamida

fosfato (NADPH) oxidase. Juntamente com a sobrecarga de Ca^{2+} , a produção de EROs é um dos principais fatores contribuintes para os danos celulares induzidos pela IR, que entre outros efeitos deletérios, culmina na abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP) [7]. A abertura do MPTP implica em perda do potencial de ação da membrana da mitocôndria, desacoplamento da fosforilação oxidativa, desencadeando em depleção de ATP e morte celular. A condição ácida ($\text{pH} < 7,0$) característica da isquemia, previne a abertura do MPTP e a hipercontratura do cardiomiócito, no entanto durante a reperfusão o “wash out” do lactato e restauração do pH fisiológico faz com haja abertura do MPTP. Além disso, sua abertura age também como atrativo químico do neutrófilo, que por sua vez causam disfunção do retículo sarcoplasmático (como o receptor de rianodina), associada a aumento e/ou manutenção da sobrecarga de cálcio e exacerbação dos efeitos deletérios das enzimas ativadas pelo cálcio (peroxidação lipídica, desnaturação enzimática e dano oxidativo direto ao DNA) [7, 20].

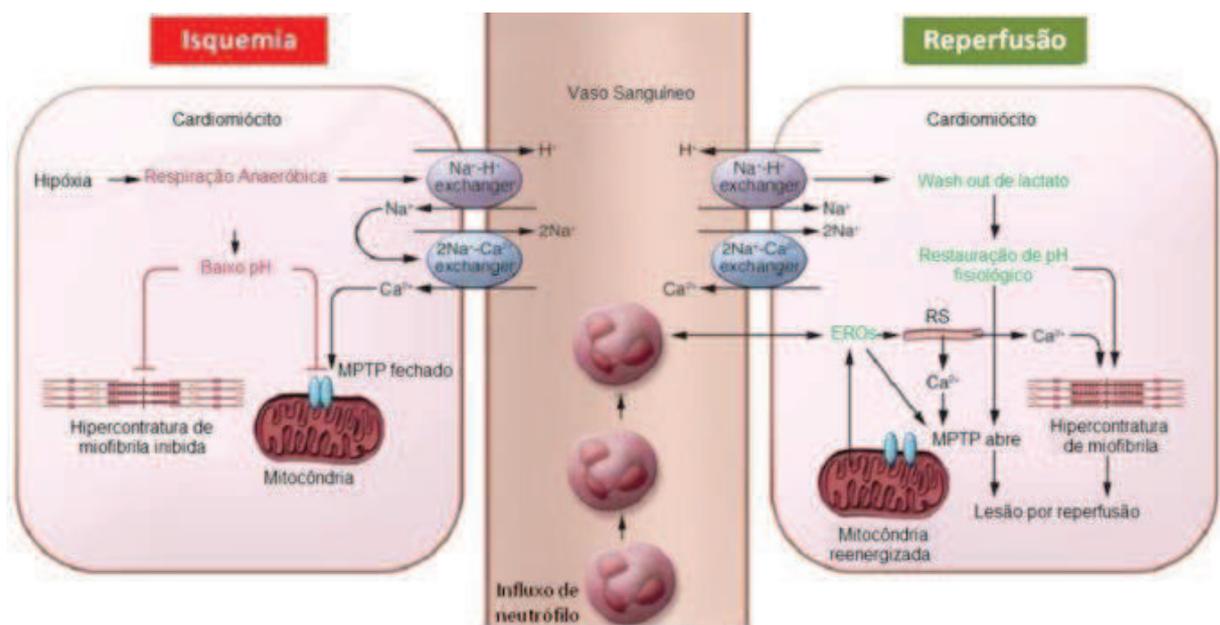


Figura 1.3: Alterações metabólicas e bioquímicas ocorridas no miocárdio em resposta à isquemia e reperfusão. Adaptado de Hausenloy et al [7]. RS, retículo sarcoplasmático; MPTP, “mitochondria permeability transition pore” (poro de transição de permeabilidade mitocondrial).

Dessa forma, apesar de necessária para a reversão da isquemia, a restauração do fluxo sanguíneo, em última análise, pode ser mais deletéria que o próprio processo de isquemia [22]. Pode haver necrose de células irreversivelmente lesadas, acentuação do edema celular e restauração não uniforme do fluxo para as porções do tecido [6].

Fica claro então, que os distúrbios metabólicos e bioquímicos em decorrência à hipóxia tissular e sua restauração são muito bem estabelecidos, porém evidências prévias demonstram

que os eventos que levam a disfunção celular e tecidual relacionam-se principalmente com a formação de EROs e sobrecarga de cálcio [6].

1.6 Estresse Oxidativo

Como discutido, o estresse oxidativo possui grande participação nos danos associados à lesão por IR. Dessa forma, torna-se necessário um entendimento básico acerca da formação de EROs e as defesas antioxidantes do organismo.

As EROs são moléculas altamente reativas, que se originam principalmente na mitocôndria devido a CTE [44]. A CTE consiste de uma série de transportadores de elétrons que operam sequencialmente, formados por proteínas integrais de membranas associadas a grupos prostéticos capazes de aceitar ou doar elétrons. Os elétrons passam através dessa cadeia do menor para o maior potencial, e à medida que são transferidos ao longo da cadeia, ocorre a liberação de energia livre suficiente para sintetizar ATP a partir do ADP (adenosina difosfato) e P_i por meio da fosforilação oxidativa. No último dos complexos que bombeiam prótons da cadeia respiratória (citocromo *c* ou complexo IV) é catalisada a transferência de quatro elétrons na forma reduzida do citocromo *c* ao oxigênio molecular, o aceitador final. A redução completa do O_2 resulta em produtos seguros (ressíntese do ATP e duas moléculas de H_2O), mas a sua redução parcial gera compostos perigosos, conhecidos como radicais livres ou EROs [45, 46].

A formação de ânion superóxido $O_2^{\bullet-}$ pode ser considerada o passo inicial para a formação de outros tipos de EROs¹, pois é gerado através de enzimas como a xantina oxidase ou NADPH oxidase, a partir da transferência de um único elétron [45]. A quantidade de superóxido no organismo é principalmente determinada pela atividade de várias enzimas antioxidantes específicas, que convertem o superóxido em uma EROs ainda menos reativa, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). No entanto, algumas proteínas específicas são capazes de converter o H_2O_2 em radical hidroxil ($OH\cdot$), uma EROs altamente reativa [45].

A formação de EROs é finamente controlada pela defesa antioxidante do organismo, que é composta principalmente pela enzima superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) e glutathione redutase (GR). A primeira linha de defesa contra radicais superóxido é a SOD, convertendo-os em H_2O_2 . Nos mamíferos existem, ao menos, três isoformas de SOD: SOD1, SOD2 e SOD3, também chamadas respectivamente de

¹ Além das espécies reativas de oxigênio citadas, ainda existem aquelas compostas por: peróxil ($RO_2\cdot$), alcóxil ($RO\cdot$), hidroperóxil ($HO_2\cdot$), ácido hipoclorídrico (HOCl), ozônio (O_3) e oxigênio singlete (1O_2).

CuZnSOD (pela composição dos co-fatores de cobre e zinco), MnSOD (composta por manganês) e EcSOD (por ser extracelular) [12]. Ambas CuZnSOD e MnSOD são intracelulares, no entanto a CuZn se localiza no citosol, enquanto a MnSOD é encontrada na mitocôndria [12]. O restante das enzimas antioxidantes tem como alvo a conversão do H_2O_2 em água, para controlar as reações de conversão dessa molécula em $OH\cdot$ [45].

Baixos níveis de produção de EROs tem sido implicadas como importantes mediadores em uma grande variedade de processos biológicos, incluindo defesa do sistema imune, na regulação da apoptose e na modulação da sinalização celular [46-49]. Contudo, quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de EROs e de agentes antioxidantes, instaura-se um quadro conhecido como estresse oxidativo. Assim como observado nas lesões por IR, o estresse oxidativo está relacionado a diversas patologias, como disfunção endotelial, câncer, diabetes e aterosclerose [50-52].

A hipóxia causa a redução na concentração de antioxidantes endógenos [6, 53], no entanto, a maior parte do estresse oxidativo característico à lesão por IR, ocorre na reperfusão, com o reestabelecimento do fluxo sanguíneo ao tecido isquêmico. Essa interrupção e retorno da fosforilação oxidativa resulta em uma “descarga” de radicais livres que danificam a mitocôndria [53]. Além disso, a sobrecarga de cálcio verificada na reperfusão é capaz de mediar a ativação da xantina oxidase e a NADPH oxidase, que são enzimas associadas à geração de EROs através de diferentes vias.

Evora et al [6] destacam que os radicais livres são nocivos na lesão por IR através de uma variedade de mecanismos, sendo eles: 1) peroxidação dos ácidos graxos das membranas celulares; 2) oxidação de grupos sulfidril inativando uma variedade de enzimas; 3) alterações do DNA inibindo a síntese de ATP e consumindo as reservas de dinucleotídeo de adenina nicotinamida (NADH); 4) direta inativação do óxido nítrico (NO) comprometendo os relaxamentos vasculares dependentes do endotélio; 5) formação de peroxinitrito, um ânion instável e tóxico, reagindo com o NO; 6) ativação de citocinas como a interleucina-1.

Tendo em vista o exposto, seria lógico pensar que a terapia com agentes antioxidantes seria naturalmente uma opção apropriada para prevenir as lesões por IR. No entanto, tantos os estudos experimentais quanto clínicos reportaram resultados controversos com a administração de agentes antioxidantes [7]. A inabilidade dos antioxidantes de entrar na célula pode ser um fator limitador, que possivelmente dificulta a obtenção de resultados mais consistentes [7]. Ainda no contexto da prevenção ou tratamento das lesões por IR, outras estratégias terapêuticas estão sendo atualmente estudadas e receberão destaque nas próximas sessões.

1.7 Tipos de Cardioproteção Contra Lesões por Isquemia e Reperusão

Como já discutido, devido ao grave problema de saúde pública que o IAM representa, se faz necessário o investimento em medidas preventivas e/ou para tratamento dos danos associados à lesão por IR. Tornando, dessa forma, essas medidas indispensáveis para redução da morbi-mortalidade de insultos isquêmicos ao miocárdio, e que em última análise possuem grande potencial na redução do elevado custo que o IAM representa para o sistema de saúde. Em função disso, inúmeros estudos se debruçaram sobre estratégias para promover cardioproteção contra lesões por IR. Atualmente, tais estratégias incluem as seguintes medidas listadas:

- Pré-condicionamento isquêmico do miocárdio (PIM), no qual breves períodos repetidos de oclusão coronariana seriam capazes de tornar o miocárdio mais resistente a isquemia prolongada subsequente [4, 5, 54];
- Pré-condicionamento pelo exercício, como já dito, caracterizado por induzir um fenótipo cardíaco resistente a lesões miocárdicas após a realização de exercício [4, 5, 12-14, 33];
- Pré-condicionamento farmacológico, que preconiza a utilização de agentes fármacos como moduladores das vias intracelulares, e reduz a área de necrose devido à lesão por IR (como exemplo a adenosina, atorvastatina e ciclosporina A);
- Hiperoxemia e hipotermia, explicadas pela menor resposta inflamatória obtida em situação de menor temperatura e oxigênio hiperbárico, com consequente redução na área de infarto [7, 55, 56];
- Pré-condicionamento remoto, mais recentemente descoberto, essa estratégia é baseada no fato do coração poder ser protegido contra lesões por IR à distância, ou seja, aplicando breves períodos repetidos de isquemia e reperusão em outro órgão ou membro (braço, por exemplo) [7, 19];
- Pós-condicionamento, que implica em reperusão intermitente após isquemia miocárdica mais prolongada no intuito de prevenir as lesões por reperusão e reduzir a área de infarto [7].

Dentre todas as estratégias listadas, o pré-condicionamento obtido através do exercício físico é o único que representa de fato um tratamento que pode ser realizado de forma regular com o intuito de proteger o coração contra lesões por IR. Já as outras estratégias, como a utilização de fármacos, perdem a ação após administração repetitiva ou só podem ser realizadas em situações especiais, como em procedimentos cirúrgicos [57].

Assim como o PIM, a cardioproteção conferida pelo exercício é bifásica. A primeira janela de proteção se inicia em torno de 30 min após o término de uma sessão aguda de exercício e dura em média 3 horas. Já a segunda janela é mais robusta, pois começa a partir de 24 horas após o término da sessão e dura por pelo menos 9 dias após (no caso de 5 sessões de exercício) [43]. Tendo em vista o efeito cardioprotetor mais consistente obtido pela segunda janela, o presente trabalho irá focar no período em que essa se compreende.

1.8 Pré-Condicionamento do Miocárdio por Exercício

Evidências epidemiológicas indicam que há forte correlação entre indivíduos ativos e àqueles que sobrevivem a IAM [10]. Apesar da dificuldade de se obter confirmação direta dos efeitos do exercício na extensão do IAM em humanos [57], diversos estudos forneceram evidências indiretas do efeito cardioprotetor do exercício em humanos [58, 59]. Zdrengeha et al [58] mostraram que a depressão no segmento ST induzida pelo exercício foi significativamente atenuada em pacientes de alto risco durante sessões subsequentes de exercício. Na mesma linha, Lambiase et al [59] exercitaram pacientes com DAC previamente à intervenção coronariana percutânea e observaram que a deflação no segmento ST comum do procedimento foi reduzida.

Cardioproteção induzida pelo exercício também tem sido demonstrada em modelos animais, corroborando os resultados obtidos na pesquisa clínica. O estudo de McElroy et al [21], foi um dos primeiros a demonstrar que a prática regular de exercícios físicos é capaz de conferir cardioproteção. Nesse estudo, ratos foram submetidos a treinamento físico de natação (1h/ sessão, 5 dias por semana durante 5 semanas), e 48 h após o término do treinamento, foi realizada oclusão da artéria coronária. Após 48 h da cirurgia, foi verificada redução de 30% na área de infarto nos animais treinados ($21,5 \pm 1,9\%$ vs. $31,3 \pm 2,6\%$). Resultado similar foi encontrado por Brown et al [60], que após 20 semanas de treinamento na esteira, encontraram 25% de redução na área de infarto dos ratos treinados ($24 \pm 3\%$ vs. $32 \pm 2\%$) em resposta a 1h de isquemia e 2h de reperfusão, induzidas em modelo de coração isolado, ou seja, Langendorff. Em adição, os autores também relataram uma melhora da função cardíaca com o treinamento físico devido a maior manutenção dos valores de pressão desenvolvida do VE (PDVE) e pressão diastólica final (PDF) durante a isquemia e reperfusão. Ainda nesse contexto, Powers et al [61] também observaram que os níveis pressóricos de ratos exercitados por 10 semanas se mantiveram mais altos durante lesão por IR comparados a animais controles. Em função do aqui exposto, parece inegável que o treinamento físico aeróbio

protege o coração contra insultos de IR, tanto por atenuação da morte tecidual quanto por maior manutenção da função cardíaca.

No que se refere à intensidade do exercício necessária para conferir cardioproteção, foi demonstrado que cargas abaixo de 55-60% do consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$) não protegem contra disfunção miocárdica após isquemia [62]. Em contrapartida, resultados controversos foram encontrados por Bowles et al [63] que compararam a função cardíaca de ratos treinados durante 11-16 semanas com sessões de 60 min em intensidades baixa (20 m/min, 0% de inclinação), média (30 m/min, 5% de inclinação) ou alta (10 estímulos de 2 min a 60 m/min com recuperação de 2 min a 16 m/min, com inclinação a 5%). Ao fim do treinamento e após 25 min de isquemia e 45 min de reperfusão no Langendorff, o percentual de recuperação do débito cardíaco obtido nos grupos de baixa, média e alta intensidade (61 ± 6 , 68 ± 9 e 73 ± 5 , respectivamente) foi significativamente maior comparado ao controle sedentário (36 ± 7). Tais resultados foram similares aos de Lennon et al [64], que apontaram que 3 sessões de exercício realizados a 55% ou 75% do $VO_{2máx}$ durante 60 min resultaram em redução de, respectivamente, 20% e 10% no débito cardíaco de ratos submetidos a lesão por IR no Langendorff, enquanto os animais controle apresentaram redução de 40%. Em conjunto, esses resultados sugerem que apesar do nível de cardioproteção adquirida com o exercício ser dependente da sua intensidade, mesmo a aplicação de cargas baixas é suficiente para proteger o coração.

No que tange ao tempo de treinamento físico, Hamilton et al [65] demonstram que 5 sessões de exercício já são suficientes para reduzir a incidência de arritmias ventriculares após lesão por IR *in vivo*. Ainda nesse sentido, Demirel et al [66], ao avaliar a função cardíaca de ratos submetidos a lesão por IR exercitados por 60 min/dia por 3 ou 5 dias a 60-70% do $VO_{2máx}$, observaram que ambos os grupos exercitados mantiveram maiores valores de PDVE em comparação aos animais controle. Dessa forma os autores concluíram que 3 a 5 dias consecutivos de exercício já são suficientes para melhorar a função contrátil do miocárdio durante a lesão *in vivo* por IR. Pesquisas subsequentes também demonstram que poucas sessões de exercícios (tais como 1-3) já são suficientes para proteger o coração [14, 67].

1.9 Mecanismos Envolvidos no Pré-Condicionamento do Miocárdio por Exercício

Embora já esteja bem descrito que o exercício é capaz conferir cardioproteção, através de um efeito direto no miocárdio, o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda é motivo de debate [12, 20, 22]. De forma geral, alguns dos mecanismos propostos envolvem: (a) aumento na

produção de proteínas de choque térmico (HSP) [4, 20, 22]; (b) remodelamento vascular, associado a aumento no número e diâmetro de capilares e artérias coronárias [4, 20]; (c) aumento na capacidade antioxidativa cardíaca, associado à redução na produção de EROs nas mitocôndrias do miocárdio [4, 16, 20, 22]; e (d) melhora na função dos canais de potássio dependentes de ATP presentes no sarcolema e mitocôndria (canais K-ATP sarco / mito) [20, 22].

Proteínas de Choque Térmico

Já foi demonstrado que, ao menos a nível celular, diversas proteínas desempenham importante papel na manutenção da homeostase. Portanto, quando o organismo é exposto a situações de estresse (por exemplo, hipóxia, hipertermia, isquemia e acidose), a síntese dessas proteínas pode ser comprometida [20]. Em resposta, o organismo sintetiza proteínas, chamadas de proteínas de choque térmico (“heat shock protein” - HSP), que auxiliam na manutenção da homeostase [12].

As HSPs são classificadas em vários grupos de acordo com seu peso molecular: 1) 8 – 32 kDa; 2) 40- to 60-kDa; 3) 70-kDa; 4) 90-kDa; e 5) 100- to 110-kDa [68]. Sabe-se que várias famílias, tais como a HSP10, HSP60 e HSP90, estão associadas a efeitos cardioprotetores, no entanto, a família da HSP70 é a que merece maior destaque [20]. Os membros mais proeminentes da família das HSP70 são a HSP73 e a HSP72. A HSP73 é sintetizada em todas as células de forma constitutiva e após episódio de estresse, sofre ligeiro aumento. De forma contrária, a HSP72 só pode detectada após um evento estressante [68], principalmente como lesões por IR.

Atualmente o exercício aeróbio agudo é considerado um estímulo capaz de elevar o nível de HSP70 miocárdicas [67, 69]. Nesse sentido, Locke et al [69], demonstraram que após sessões de 40 e 60 min de exercício (24 m/min, 0% de inclinação), a expressão de HSPs no miocárdio de ratos é aumentada. O mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não é claro, mas os autores associaram a estresse térmico, hipóxia, redução no pH intracelular, estresse oxidativo, depleção de glicose e/ou aumento citosólico de cálcio, todos associados ao exercício.

Estudos prévios sugeriram que o aumento na expressão de HSP72 induzido pelo exercício está associado a proteção contra lesões por IR [66, 70], tornando essa uma forte hipótese para justificar o pré-condicionamento induzido pelo exercício. No entanto, mais recentemente, essa questão foi abordada em estudo muito interessante de Taylor et al [71]. No estudo, para evitar o aumento da expressão miocárdica de HSP72 provocada pela elevação na temperatura corporal no exercício, os autores treinaram animais em ambas as temperaturas,

baixa (4°C) e ambiente (22°C). Como resultado, verificaram que, independente do nível de HSP72, ambos os grupos apresentaram cardioproteção contra lesão por IR *in vivo*. Em estudo similar, Hamilton et al [72], chegaram também a conclusão de que a HSP72 não é essencial para o pré-condicionamento pelo exercício.

Remodelamento Vascular

As artérias do leito vascular coronário podem ser classificadas, de acordo com seu calibre, em: 1) artérias de condução (> 1000 µm); 2) pequenas artérias (1000 – 300 µm); 3) artérias de resistência (300 – 150 µm); 4) arteríolas (150 – 10 µm); e finalmente 5) capilares (~ 6 µm) [73].

O limite entre a macro e microcirculação não possui uma definição exata, porém usualmente classificam-se como microvasos aqueles que possuem diâmetros inferiores a 150 µm [74]. Como demonstrado na figura 1.4, as arteríolas que se apresentam na porção mais proximal são classificadas de primeira ordem, sendo constituídas de uma espessa camada contínua de músculo liso e dividem-se sucessivamente em arteríolas de segunda à quarta ordem, sendo a última ordem chamada de metarteríolas, possuindo apenas uma camada descontínua de músculo liso na parede do vaso. A porção arteriolar da microcirculação é responsável por uma parcela importante do gradiente de pressão hidrostática arterio-venoso e portanto intervém na regulação da pressão arterial (PA). Os capilares, por sua vez, apresentam uma única camada de células endoteliais sobre uma membrana basal. São provenientes de ramificações das metarteríolas, que podem originar em média uma dezena de capilares cada uma, podendo conter em suas bifurcações os esfíncteres pré-capilares, estruturas musculares que circundam a entrada dos capilares, controlando, portanto, o fluxo capilar. Os esfíncteres pré-capilares são também responsáveis por um fenômeno fisiológico de redistribuição do fluxo sanguíneo de um leito capilar a outro (“shunting”). O leito capilar é responsável pela nutrição aos tecidos, pois é na fina parede capilar que ocorre a troca de fluidos, eletrólitos e oxigênio.

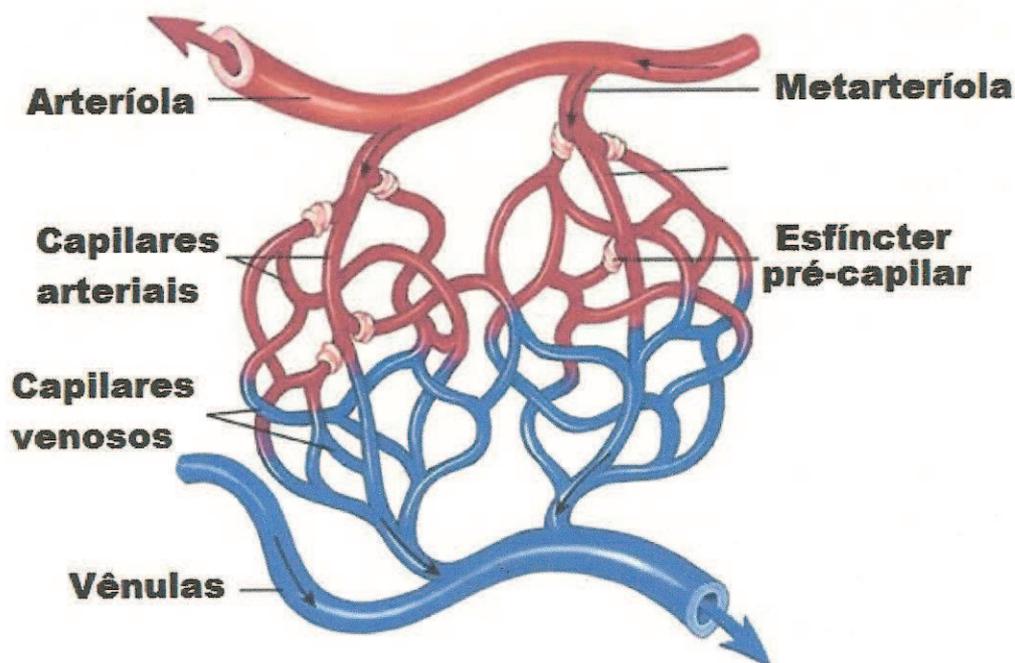


Figura 1.4: Ilustração do leito vascular arterial e capilares coronários. Adaptado de Guyton et al [75].

O conceito de remodelamento vascular pode ocorrer de quatro formas distintas, pelos quais os vasos de diferentes diâmetros aumentam tanto em número quanto em calibre: angiogênese, “arteriolarização”, remodelamento arterial e “arteriogênese” [73]. A angiogênese é a expansão da rede de vasos a nível microcirculatório, através da formação de novos capilares [20]. No entanto, além do aumento no número de vasos, os capilares também podem aumentar de calibre e transformar-se em arteríolas, através de um processo conhecido como “arteriolarização” [76]. Já o remodelamento arterial se refere ao processo pelo qual as artérias aumentam ou diminuem de diâmetro [73]. De forma similar, a “arteriogênese” também causa aumento do diâmetro das artérias. No entanto, esse processo só ocorre em resposta à isquemia por oclusão de grandes artérias, no intuito de promover caminho alternativo para perfusão da região isquêmica do miocárdio [73].

Apesar de poucos relatos, já foi descrito na literatura que o treinamento físico aeróbico é capaz de causar remodelamento nas artérias coronárias de humanos [77] e de animais [78]. Kramsch et al [78] mostraram em pesquisa experimental que a área transversa da artéria descendente anterior esquerda, da coronária direita e das circunflexas quase dobrou de tamanho após 24 meses de exercício (3 sessões / semana, 1h / sessão).

Em relação a angiogênese, em estudo muito interessante, White et al [79] avaliaram a microcirculação coronária em porcos treinados por 1, 3, 8 e 16 semanas em intensidade correspondente a 70-90% da frequência cardíaca (FC) máxima, 5 dias por semana. Apesar do

número das células endoteliais ter aumentado após 1 semana de exercício, o aumento na densidade capilar só foi possível a partir de 3 semanas de treinamento.

Acredita-se que o exercício seja capaz de modular mediadores, conhecidos como fatores de crescimento, no sentido de aumentá-los direta ou indiretamente através de vias mecânicas e forças hemodinâmicas. Diversos fatores de crescimento capazes de induzir remodelamento vascular em corações isquêmicos já foram descritos, mas o que merece maior destaque é o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) [73].

Em função do exposto, fica claro que o exercício é um potente estímulo para aumentar a capacidade de transporte vascular coronário, através de angiogênese e aumento no diâmetro de todos os níveis de vasos [80]. No entanto, sabe-se também que o remodelamento vascular do miocárdio é uma adaptação ao exercício crônico, que requer várias semanas de treinamento aeróbio [79]. Por outro lado, já foi demonstrado que o efeito de cardioproteção contra lesões por IR induzido pelo exercício pode ser observado em curtos períodos de exercício, como de 1 a 5 sessões [14, 66].

Dessa forma, a desconexão entre o período de treinamento necessário para a cardioproteção induzida pelo exercício e as alterações estruturais no leito vascular do miocárdio, sugere que os mecanismos envolvidos não são devidos a aumento no fluxo sanguíneo, mas sim relacionados a alterações bioquímicas ocorridas agudamente no miocárdio.

Antioxidantes

O organismo possui um sistema antioxidante altamente complexo, composto de agentes enzimáticos e não-enzimáticos, que trabalham sinergicamente para proteger as células e sistemas orgânicos contra danos causados por estresse oxidativo. Como já discutido, destacam-se entre os agentes não-enzimáticos a SOD, CAT e GPX [20].

No que tange ao efeito do exercício na atividade antioxidante do miocárdio, apesar de já ter sido largamente estudado, ainda não há um consenso [20]. É possível que a liberação transiente de EROs que ocorre durante o exercício pode levar a uma adaptação específica capaz de elevar a capacidade antioxidante [57]. Nesse sentido, alguns autores mostraram que o exercício foi capaz de elevar os níveis de CAT [17] e GPX [81] enquanto outros não encontraram diferença [14, 61]. Maior consenso existe quanto ao papel do exercício em promover aumento na atividade da SOD, mais especificamente da isoforma encontrada na mitocôndria, a MnSOD [20, 22, 82].

No entanto, como a cardioproteção induzida pelo exercício é um processo multifatorial, que está associado a diferentes elementos, é possível que os resultados positivos observados não estejam relacionados somente ao aumento na capacidade antioxidativa, mas também a outros fatores, como alteração em proteínas associadas ao cálcio [17]. No intuito de responder essa questão, Yamashita et al [82] utilizaram uma técnica com oligonucleotídeos anti-senso para silenciamento genético da MnSOD, e demonstraram que a inibição do aumento da expressão da MnSOD cardíaca induzida pelo exercício resulta na perda da cardioproteção. Porém, de forma contrária, Lennon et al [17] utilizaram a mesma técnica de silenciamento e por sua vez mostraram que mesmo após prevenir o aumento na MnSOD, a cardioproteção ainda era observada. Os autores alegam que esses resultados discrepantes podem ser atribuídos a diferenças nas metodologias aplicadas, como exemplo o fato de Lennon et al [17] e Yamashita et al [82] terem utilizado o modelo de lesão por IR *ex vivo* e *in vivo*, respectivamente. Portanto, fica claro que investimento adicional é necessário para entender melhor a real participação das enzimas antioxidantes na cardioproteção associada ao exercício.

Canais de Potássio Dependentes de ATP

Os canais de potássio dependentes de ATP, altamente expressos no sarcolema e mitocôndria (canais K_{ATP} sarco / mito), têm sido associados a efeito cardioprotetor [83, 84]. Acredita-se que esses canais atuem como sensores capazes de identificar o equilíbrio iônico e bioenergético celular, no intuito de preservar a homeostase cardíaca durante situações de estresse metabólico [85]. Para desempenhar tal função seu funcionamento é baseado na quantidade de ATP disponível no citosol. Os canais K_{ATP} ficam fechados durante presença abundante de ATP citosólico, mas a diminuição de ATP em decorrência de estresse metabólico (como exemplo a isquemia) estimula sua abertura [20, 83, 85].

Acredita-se que a abertura dos canais K_{ATP} sarco resulta em efluxo de K^+ do cardiomiócito, que provoca hiperpolarização da célula cardíaca e redução no número de potenciais de ação [86], que por sua vez limita a entrada de Ca^{2+} através dos canais tipo – L e evita o acúmulo intracelular de Ca^{2+} [20]. Coletivamente, isso resulta em redução na demanda metabólica cardíaca, fazendo com que a atividade na CTE seja diminuída, evitando assim a produção de EROs [86].

Além do efeito benéfico cardioprotetor que os canais K_{ATP} sarco exercem no pré-condicionamento isquêmico e farmacológico [87], já foi demonstrado papel também no exercício [83, 88, 89]. Em estudo publicado recentemente [89], são fornecidas evidências que suportam essa questão, pois verificou-se que 8 semanas de treinamento físico eram capazes de

aumentar a expressão proteica das três subunidades dos canais K_{ATP} (kir 6.1; Kir 6.2 e SUR2a). Além disso, o fato de animais “knockout” para esses canais, possuírem tolerância reduzida ao exercício e predisposição para arritmias cardíacas [90], é outro indicativo da importância desses canais para o exercício.

Ainda nesse contexto, Brown et al [88], demonstraram que 12 semanas de treinamento físico aumentaram a expressão de canais K_{ATP} em cardiomiócitos. Em adição, ao utilizarem um modelo de IR (1/2h) em Langendorff, os autores mostraram que o bloqueio farmacológico dos canais K_{ATP} sarco impediu o efeito cardioprotetor do exercício contra a lesão por IR. Resultados similares destacando a importância dos canais K_{ATP} sarco foram encontrados pelo mesmo grupo de pesquisa em estudos posteriores [83, 91].

No entanto, mais obscuro é o papel dos canais K_{ATP} mito na cardioproteção. Quanto aos seus mecanismos cardioprotetores, evidências indicam que sua abertura causa alcalinização da matriz mitocondrial, redução na produção de EROs, redução no acúmulo de Ca²⁺ mitocondrial e melhora na produção de energia na mitocôndria [4]. Apesar disso, Brown et al [88] utilizaram um inibidor dos canais K_{ATP} mito e concluíram que esses canais não eram mediadores essenciais da cardioproteção induzida pelo treinamento físico contra lesão por IR. Em contrapartida, Quindry et al [92], ao inibir os canais K_{ATP} mito, verificaram que a proteção contra arritmias de ratos exercitados era anulada. Dessa forma, não pode ser descartada a hipótese de que os canais K_{ATP} mito, em adição aos canais K_{ATP} sarco, também sejam capazes de promover cardioproteção após exercício físico.

Apesar de já estar bem consolidada a relação da cardioproteção pelo exercício com a abertura dos canais K_{ATP}, a cascata de sinalização intracelular que ocorre em resposta ao exercício e resulta na abertura desses canais ainda não foi esclarecida. Como mostra a figura 1.5, acredita-se que os canais K_{ATP} estejam associados ao sistema de opióides [23], que por sua vez sofrem influência com o exercício físico [14], tornando-os possíveis candidatos como mediadores da cardioproteção induzida pelo exercício.

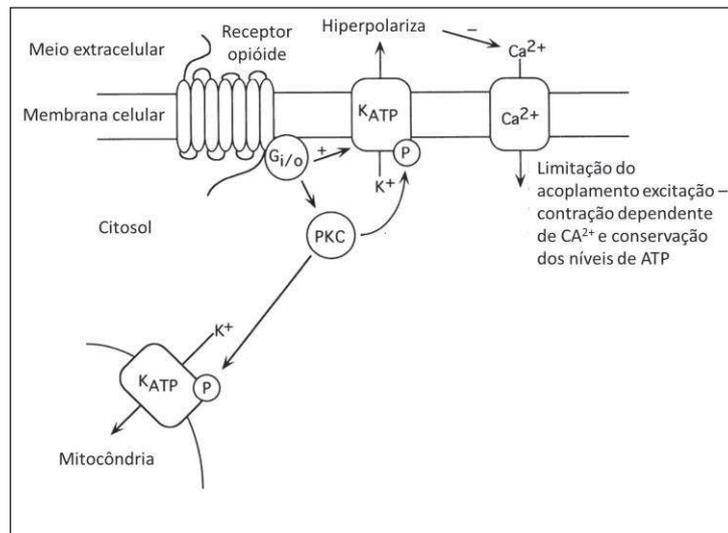


Figura 1.5: Diagrama esquemático de possível via de sinalização envolvida na cardioproteção induzida pelos canais K_{ATP} e opióides. Adaptado de Schultz et al [23].

1.10 Sistema Opióide e Cardioproteção

Os opióides têm sido usados no tratamento da dor por centenas de anos. A fonte do ópio, a substância bruta, e da morfina, um de seus constituintes purificados, é o “suco” (opus em grego) extraído da papoula *Papaver somniferum*. Em 1806, o farmacêutico alemão Sertuener isolou o que chamou “princípio soporífico” do ópio, e em 1817 denominou-o de morfina, em referência a Morfeu o deus grego dos sonhos. A morfina foi amplamente utilizada para tratar soldados feridos durante a guerra civil americana.

No entanto, os estudos para a investigação das propriedades cardioprotetoras dos opióides só começaram mais recentemente, quando Schultz et al [24], em 1995, mostraram que o PIM, fenômeno já descrito aqui pela capacidade de reduzir a lesão isquêmica do miocárdio, tem como um dos seus mediadores os receptores opióides. Estes estudos levaram a descoberta de que a morfina, além de tratar a dor associada ao IAM, também pode auxiliar na redução da área do IAM, através de mecanismos associados ao PIM.

Desde a descoberta de Schultz et al [24], o sistema opióide e as drogas que nele atuam estão ganhando destaque devido a um efeito no sistema cardiovascular [23]. Já é sabido que os níveis de peptídeos opióides endógenos aumentam durante situações de estresse, como exemplo durante isquemia [23, 93]. De fato, estudos já demonstraram que a β -endorfina (agente opióide endógeno) estava aumentada em pacientes com isquemia miocárdica [94] e após angioplastia coronariana [95]. Dessa forma, foi especulado que o aumento nos níveis de peptídeos opióides em tecidos ventriculares infartados pode ocorrer em função de um

mecanismo compensatório para contrapor o alto nível de catecolaminas liberadas durante a isquemia, no intuito de minimizar a área de infarto [23].

De forma interessante, a hibernação de animais, período conhecido por reduzir significativamente o metabolismo, a FC e a frequência respiratória, é induzida por uma substância de natureza opiácea, chamada de fator indutor de hibernação (HRF) [96]. Já foi demonstrado que o uso de d-Ala2-d-Leu5 encefalina (DADLE), um agonista de opióides amplamente utilizado, bem como de HRF, são igualmente eficazes em estender o tempo de sobrevivência de órgãos e preservação de tecidos antes de transplante de órgãos [97].

Em adição, já foi relatado que a utilização de antagonistas de receptores opióides em animais, foi capaz de reverter a cardioproteção conferida pelo PIM [24, 98]. De forma similar, a ativação desses receptores através de agonistas, resulta em potente resposta cardioprotetora de redução na área de infarto e morte celular de cardiomiócitos, de forma equivalente ao PIM [99]. Como já foi dito, o PIM é um fenômeno no qual breves períodos de oclusão coronariana seguidos de reperfusão são capazes de tornar o miocárdio mais resistente a um insulto isquêmico prolongado subsequente. O PIM é capaz de reduzir a área de necrose miocárdica e a taxa de depleção de ATP. Tal fenômeno já foi demonstrado em várias espécies de mamíferos, incluindo porcos [100], coelhos [101], ratos [102] e cães [103]. Estudos mais recentes em pacientes sugeriram a possibilidade da ocorrência do PIM também em humanos [104, 105].

Em estudo muito interessante, Schultz et al [99] utilizaram a morfina para estimular os receptores opióides e verificaram que a redução na área de infarto era similar a obtida com o PIM. Além disso, os autores verificaram abolição do efeito cardioprotetor da morfina após tratamento com antagonistas dos canais K_{ATP} , o que sugere envolvimento desses canais nessa resposta. De fato, a literatura indica que as vias envolvidas na produção do efeito cardioprotetor dos opióides incluem a proteína quinase C (PKC), tirosinas quinases, proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e canais K_{ATP} [23].

1.11 Tipos de Receptores Opióides e Cardioproteção

A ideia de múltiplos receptores pertencentes à família dos opióides é um conceito bem estabelecido, sendo três classes principais de receptores opióides identificadas: kappa (κ), mu (μ) e delta (δ), sendo cada classe composta por múltiplos subtipos [23]. As três classes de receptores foram identificadas, isoladas e clonadas, permitindo a caracterização de suas sequências de bases de nucleotídeos [106-108]. Os receptores opióides pertencem a mesma família de receptores acoplados a proteína-G e possuem homologia estrutural: uma região

aminoterminal extracelular, sete domínios transmembrana e uma estrutura carboxila-terminal intra-celular.

Os ligantes endógenos dos opióides incluem três famílias de peptídeos: β -endorfinas, encefalinas e dinorfinas, que apesar de possuírem maior afinidade pelos receptores mu, delta e kappa; respectivamente, não se ligam exclusivamente a nenhum receptor. A β -endorfina, encefalina e a dinorfina são derivadas da pro-opiomelanocortina, pró-encefalina e pró-dinorfina; respectivamente [109].

Quanto à região, os receptores opióides foram localizados no tronco cerebral, vasos sanguíneos, terminais nervosos, medula suprarrenal e centro respiratório e cardiovascular do hipotálamo [23, 110]. Quanto a presença desses receptores nos cardiomiócitos, diversos estudos revelaram que os receptores delta e kappa, mas não o mu, são encontrados nos tecidos ventriculares cardíacos de animais [110, 111]. Isso reforça a ideia de que existe um sistema intrínseco desses receptores no coração que contribui para alterações funcionais no miocárdio saudável e doente, tais como atenuação da resposta adrenérgica associada à redução na performance cardíaca e efeito antiarrítmico.

Atenção aumentada tem sido dada ao tipo de receptor opióide responsável pela cardioproteção, no entanto isso ainda não é claro. Evidências envolvendo o PIM sugerem que o receptor opióide delta pode ser responsável pelo seu efeito cardioprotetor [112-114]. Nesse sentido, Liang et al [113] verificaram que a estimulação dos receptores opióides com morfina mimetizava a cardioproteção do PIM em modelo de cardiomiócitos isolados, e que esse efeito era bloqueado após utilização de antagonista de receptores delta. Os resultados encontrados nesse estudo, além de fortalecer a hipótese da participação dos receptores delta, também dizem respeito ao envolvimento dos receptores mu. Pois, o fato do efeito cardioprotetor mediado pelos opióides ter sido verificado em cardiomiócitos e dos receptores mu não serem expressos nesse tecido, nos leva a crer que esses receptores não são fundamentais para obtenção desse efeito. Em adição, estudos prévios que fizeram uso de antagonistas seletivos de mu mostraram não haver modulação da área de infarto [110, 112, 115].

Mais obscuro, no entanto, é o papel dos receptores kappa em mediar o efeito protetor. Apesar da presença abundante desse receptor no VE de diversas espécies [110, 111], evidências descartam sua participação na cardioproteção [112, 114, 115]. Schultz et al [112], ao testar a influência de um antagonista seletivo de receptor kappa (nor-binaltorfimina) no efeito protetor do PIM em ratos submetidos a 30 min de isquemia e 2h de reperfusão, verificaram que o uso da droga não influenciou os resultados encontrados. Em contrapartida, Wang et al [28], verificaram que ambos os bloqueios com nor-binaltorfimina e naltrindole (antagonista seletivo de receptor delta), atenuaram a redução no infarto observada após PIM.

Os autores ainda mostraram que os agonistas de receptores kappa e delta mimetizaram o efeito do PIM na redução da área de infarto. No entanto, somente o antagonista e agonista de kappa foram capazes de atenuar e mimetizar; respectivamente, a ação antiarrítmica do PIM. Isso sugere que somente o receptor kappa é capaz de mediar ambos os efeitos benéficos do PIM no infarto e arritmias induzidas por isquemia, enquanto o receptor delta influencia somente na redução da área de infarto. Além disso, ao utilizar antagonistas de PKC e canais K_{ATP} , os autores sugeriram participação dessas vias no efeito mediado por receptor kappa.

Esses resultados, em conjunto, sugerem que o papel de cada subtipo específico de receptor opióide no efeito cardioprotetor do PIM ainda não está elucidado.

1.12 Opióides, Exercício e Cardioproteção

Sabe-se atualmente que o exercício, assim como outras situações de estresse, é capaz de aumentar o nível dos precursores de peptídeos opióides [14, 116]. De fato, já em 1984, Howlett et al [117] demonstraram que sessões agudas de exercício de corrida induziram aumento significativo na liberação de β -endorfina em jovens mulheres, e que esse padrão não era alterado após 8 semanas de treinamento físico. Nesse estudo, o exercício físico foi também mostrado como o primeiro estímulo fisiológico capaz de elevar a liberação da met-enkefalina, uma precursora da encefalina. Já em relação ao impacto do exercício físico na expressão gênica dos receptores opióides, um estudo demonstrou aumento transitório imediatamente após uma sessão aguda de exercício físico (25 min a 24 m/min) no coração de ratos [14].

Na literatura, a interpretação do papel desses resultados de aumento nos níveis de peptídeos opióides e de seus receptores tem sido feita mais no sentido de melhorar a capacidade física máxima, em função da atenuação da percepção de desconforto associada ao exercício [118]. Associa-se a liberação de opióides, principalmente a β -endorfina, com a dor e a decisão de continuidade do exercício [118]. Já foi demonstrado que o bloqueio dos receptores opióides por naloxona, durante teste incremental máximo em humanos, foi capaz de reduzir o tempo de teste, o $VO_{2máx}$ e a FC máxima observada [119] em resposta ao esforço. Ao final, os autores concluíram que indivíduos saudáveis, quando submetidos a teste máximo e injeção de naloxona, finalizavam o teste máximo mais em função da percepção de cansaço que propriamente de limitação fisiológica.

Apesar do efeito analgésico do sistema opióide, um possível papel desse sistema no funcionamento cardiovascular em resposta ao exercício não pode ser descartado. Pois, partindo da pressuposta atuação dos opióides na cardioproteção exposta anteriormente, esse

aumento da liberação e expressão dos opióides observados após o exercício poderia estar associado a seu efeito cardioprotetor induzido pelo exercício. No entanto, somente foram encontrados três trabalhos que se debruçaram sobre o possível envolvimento dos opióides como mecanismo responsável pelo pré-condicionamento obtido com o exercício.

A primeira evidência na literatura de que os opióides estavam envolvidos no efeito cardioprotetor do exercício foi fornecida pelo trabalho de Dickson et al [14], no qual foi demonstrado que a redução de 50% na área de infarto associada a uma sessão de exercício (25 min a 25 m/min) foi completamente abolida após o bloqueio não-seletivo dos receptores opióides com naltrexona em ratos. Efeito esse que foi perdido após 5 dias da sessão de exercício. Curiosamente, os autores não encontraram diferença significativa entre os animais exercitados e controles quanto à função ventricular medida no Langendorff. Além disso, a expressão dos precursores dos peptídeos opióides e seus respectivos receptores estava aumentada somente imediatamente após o exercício. Infelizmente, os autores não forneceram informações mais precisas acerca do protocolo de exercício realizado, como exemplo o $VO_{2máx}$.

No entanto, esse trabalho fez despertar o interesse para novas investigações nesse sentido, pois em se baseando nos achados de Dickson et al [14], Galvão et al [15] se propuseram a comparar o efeito preventivo cardioprotetor induzido pelo exercício crônico mediado pelos opióides com outras estratégias cardioprotetoras em ratos após infarto. Como resultado, foi verificado que 12 semanas de treinamento físico em esteira rolante (60% do $VO_{2máx}$ durante 60 min por 5 vezes na semana) eram capazes de reduzir a área de infarto comparado aos animais controles e de forma similar ao PIM, a infusão de morfina por si só e associada ao exercício físico. No entanto, quando era acrescentada a naloxona à infusão de morfina ou ao exercício físico, esse efeito protetor era abolido. Isso sugere que os receptores opióides estavam envolvidos, ao menos em parte, nessa resposta. Em adição, vale destacar que o grupo que foi submetido a treinamento físico em adição à infusão de morfina promoveu mesma redução na área de infarto comparado ao grupo que somente treinou ou recebeu morfina. Isso leva a crer que a proteção conferida pelo exercício não ocorre de forma sinérgica à morfina.

Mais recentemente, de forma bastante interessante, Michelsen et al [19] coletaram o plasma de 13 homens antes e após o PIM e exercício físico vigoroso (realizado 1 semana após o PIM). Em seguida, foi verificado que a perfusão desse plasma humano em coração de coelhos era capaz de reduzir a área de infarto após lesão por IR em Langendorff. Foi visto também que a infusão de naloxona no Langendorff abolia o efeito cardioprotetor observado. A partir desses resultados, os autores concluíram que tanto o pré-condicionamento por

exercício físico como por PIM, era transferido de forma remota, inclusive de um indivíduo para outra espécie. Além disso, essa resposta era mediada por um fator humoral dependente do sistema opióide.

Apesar dos resultados promissores dos estudos aqui expostos, ainda é incipiente o conhecimento acerca dos mecanismos responsáveis pela cardioproteção induzida pelo exercício. Tendo em vista o grave problema clínico que as lesões por IR representam e que a prática de exercícios físicos é considerada a única estratégia de pré-condicionamento sustentada capaz de proteger o coração contra esse tipo de lesão, torna-se importante melhor entender as vias envolvidas nesse efeito. Nesse sentido, pouco se sabe sobre a contribuição dos opióides como mecanismo da cardioproteção conferida pelo exercício. Aliado a isso, não foi encontrado nenhum estudo que teve por objetivo verificar qual dos subtipos de receptores opióides seria o responsável pelo efeito protetor do exercício. Essa informação seria, no mínimo, útil para melhor entender a sucessão de eventos que ocorrem após o exercício e levam ao desenvolvimento do quadro de cardioproteção.

2 *Objetivos*

2.1 Objetivo Geral

Investigar a participação dos receptores opióides na cardioproteção contra a lesão de IR induzida pelo exercício aeróbio de curta duração com intensidade moderada em ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Verificar efeito cardioprotetor do exercício e a participação do sistema opióide em modelo de IR *ex vivo*.
- 2) Verificar efeito cardioprotetor do exercício e a participação do sistema opióide em modelo de IR *in vivo*.
- 3) Verificar influência da participação de outros potenciais mecanismos na cardioproteção induzida pelo exercício.
- 4) Investigar envolvimento de cada tipo de receptor opióide (Mu, Delta e Kappa) na cardioproteção induzida pelo exercício.

3 *Materiais e Métodos*

A metodologia deste trabalho foi dividida em diferentes sessões de acordo com os objetivos específicos, descritos no capítulo anterior. No entanto, os pontos 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4 são comuns a todos os objetivos.

3.1 Procedimentos Éticos

Os procedimentos realizados em ratos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz, sob o número LW-4/11, de acordo com a Lei 11794/08. A carta de aprovação da licença encontra-se no Anexo 1.

3.2 Animais

Foram utilizados ratos wistar machos adultos, com 6 semanas de idade (peso entre 250-300 g), fornecidos pelo CECAL (Centro de Criação de Animais de Laboratório) da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos em condições controladas de umidade ($60\pm 10\%$), temperatura ($21\pm 2^\circ\text{C}$) e luz (ciclo de 12 horas claro/escuro), com livre acesso a ração² e água.

3.3 Determinação da Capacidade Máxima de Exercício

A capacidade máxima de exercício foi determinada pelo $\text{VO}_{2\text{máx}}$ medido através de um sistema de calorimetria de circuito aberto, através da análise dos gases expirados, durante um teste incremental máximo (TIM). Como demonstrado na figura 3.1, o TIM foi realizado em esteira ergométrica, acoplada a uma caixa metabólica (AVS projetos, São Paulo, SP), com fluxo de entrada de ar mantido a 3500 ml/min. A fração de O_2 foi medida continuamente a uma frequência de aquisição de 20 Hz (AQCAD, AVS projetos, São Paulo, SP). O $\text{VO}_{2\text{máx}}$ foi calculado utilizando a variação na fração de oxigênio (%) e o fluxo de ar da caixa metabólica, através da seguinte equação:

$$\text{VO}_{2\text{máx}} (\text{ml/Kg/min}) = \frac{(20,93 - \% \text{O}_2 \text{ consumido}) * \text{Fluxo de ar}}{\text{Peso do animal (Kg)}} / 100$$

² Nuvilab – CR1, Nuvital Nutrientes Ltda, Colombo, Paraná – Brasil.

Para a determinação do $VO_{2\text{máx}}$, inicialmente os animais permaneceram por 15 minutos na esteira sem se exercitar para a estabilização do aparelho. Em seguida, o TIM era iniciado com velocidade de 10 m/min e a cada 3 minutos a velocidade era aumentada em 3 m/min até que a exaustão dos animais fosse constatada, ou seja, quando os animais não conseguiam manter o ritmo da corrida por pelo menos 5 segundos, mesmo quando recebiam estímulos elétricos da esteira.

O TIM foi realizado antes do início das sessões de exercício, sendo que todos os animais foram adaptados à corrida na esteira por três sessões consecutivas com duração de 15 minutos a velocidade de 12 m/min na semana anterior ao teste.

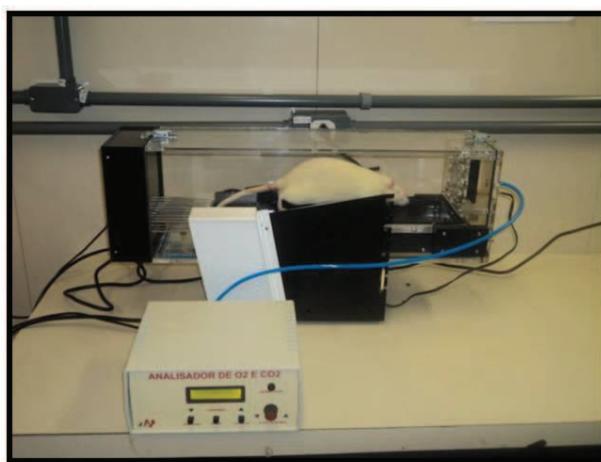


Figura 3.1: Teste incremental máximo realizado para determinação do $VO_{2\text{máx}}$ em esteira acoplada à analisador de gases.

3.4 Sessões de Exercício Físico

O exercício foi realizado em esteira ergométrica (HT 2.0, Hectron Fitness Equipamentos, Rio de Janeiro, RJ) por 4 sessões em dias consecutivos, entre 8:00 e 10:00 am, sendo cada sessão com 60 min de duração a 70% do $VO_{2\text{máx}}$. Essa intensidade de exercício foi utilizada em função de estudos prévios já terem demonstrado que 70% do $VO_{2\text{máx}}$ é suficiente para promover cardioproteção induzida pelo exercício [72]. Após 24 horas da última sessão de exercício ou confinamento, os ratos foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos para indução de I-R (Figura 3.2). Os ratos do grupo controle foram colocados na esteira pelo mesmo período de tempo que os demais grupos, no entanto, sem movimento.

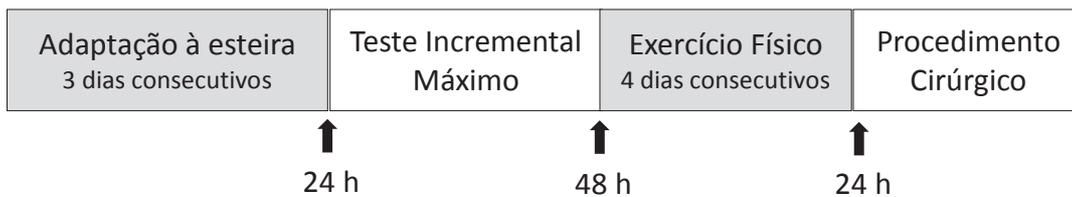


Figura 3.2: Diagrama organizacional do protocolo de exercício.

3.5 Verificação do Efeito Cardioprotetor do Exercício e a Participação do Sistema Opióide em Modelo de IR *ex vivo*

Protocolo Experimental

Para verificar o efeito cardioprotetor do exercício e a participação do sistema opióide em modelo de IR *ex vivo*, ou seja Langendorff, os ratos foram divididos em 3 grupos experimentais:

- 1) Grupo controle submetido a IR (CT; n=4);
- 2) Grupo submetido a exercício físico e IR (Exe; n=4);
- 3) Grupo submetido a exercício físico, IR e tratamento com naloxona (10 mg/kg, ip.), um antagonista não-seletivo de receptores opióides, 15 minutos antes de cada sessão de exercício (Exe+N; n=4).

A figura 3.3 ilustra a divisão de grupos:

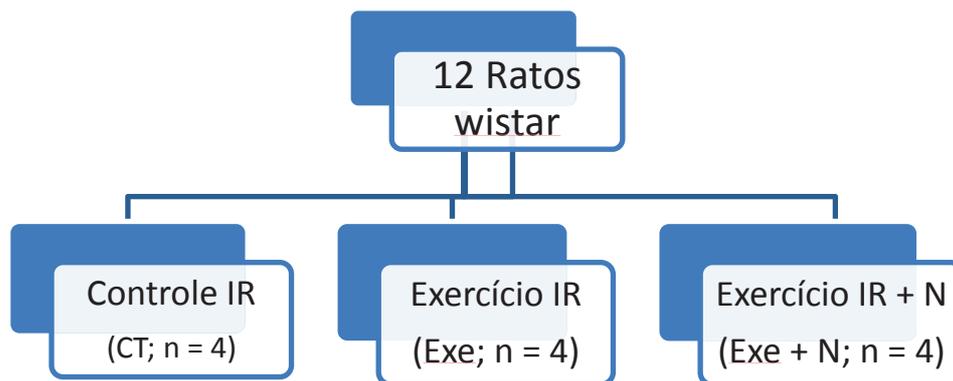


Figura 3.3: Divisão dos grupos experimentais no modelo de isquemia reperfusão *ex vivo*.

Preparação do Coração Isolado

Vinte e quatro horas após a última sessão de exercício ou repouso, os animais, previamente heparinizados (500 iu/Kg, ip.), foram eutanasiados por inalação de CO₂ e deslocamento da coluna cervical. Após realização de esternotomia mediana e pericardiotomia, o coração era rapidamente removido e instalado em um aparelho de coração isolado, de acordo com o método de Langendorff (Figura 3.4). O coração permanecia perfundido retrogradamente via circulação coronariana com solução de Krebs-Henseleit (mM: 118 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 10 glicose e 1,8 CaCl₂, pH 7,2; gasificado com 95% O₂ – 5% CO₂, 37°C), distribuído com fluxo constante de 10 ml/min, através de bomba peristáltica (Gilson, Middleton, WI, EUA).

Após 30 min de período basal para estabilização do sistema, todos os corações foram submetidos a 30 min de isquemia global seguida de 1 h de reperfusão. A isquemia era realizada desligando a bomba peristáltica, e interrompendo o fluxo de solução de Krebs aerado, e na reperfusão, a bomba era religada.

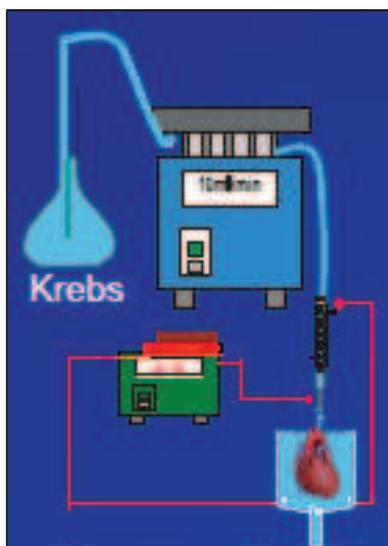


Figura 3.4: Representação esquemática da montagem de Langendorff mostrando solução de Krebs sendo perfundida no coração através da bomba peristáltica fixada a 10 ml/min, após aquecimento a 37°C.

Medidas Hemodinâmicas

Para monitorização da pressão do VE, um balão de látex contendo solução fisiológica foi introduzido no VE, através do átrio esquerdo, e acoplado a um transdutor de força. Para

análise, foi utilizado o LabChart 7.1.2 (ADInstruments Inc., Colorado Springs, CO, EUA) O balão foi ajustado para PDF (a rever, pressão diastólica final) entre 5-10 mmHg no período basal.

Foi calculada a pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo (PDVE), através da média da pressão máxima e mínima do ventrículo esquerdo (P máx e P min, respectivamente) (Figura 3.5). A PDVE foi registrada durante todo o experimento e expressa como % do basal. Além disso, foram mensuradas também as velocidades máximas de aumento e queda da pressão no ventrículo esquerdo ($dP/dt_{máx}$ e dP/dt_{min} , respectivamente).

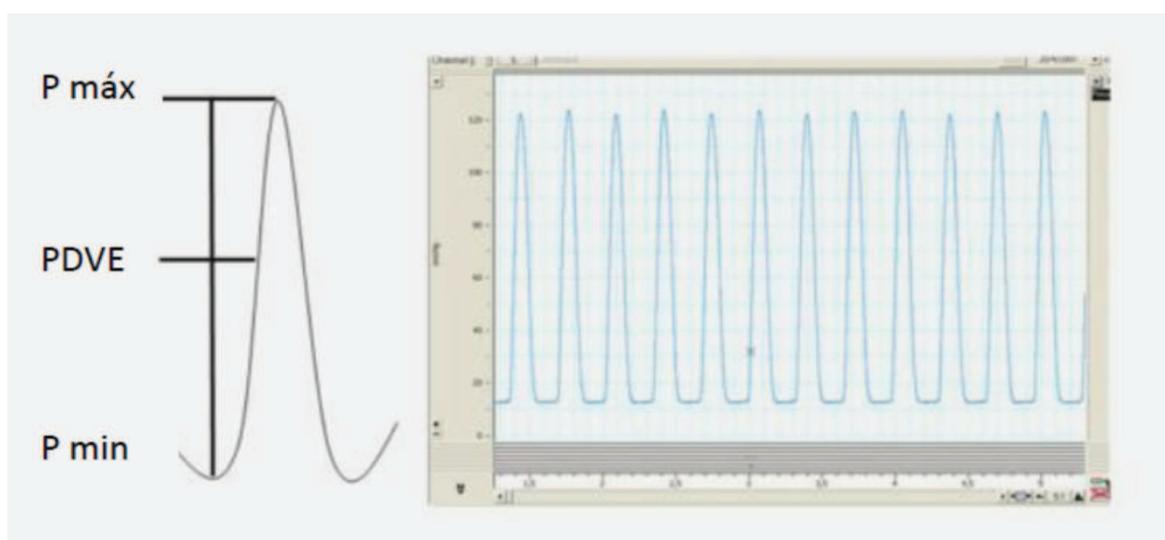


Figura 3.5: Ilustração da determinação da pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo (PDVE), através da média da pressão máxima (P máx) e pressão mínima (P min) medidas no ventrículo esquerdo.

Determinação da Área de Infarto

No intuito de medir a área de infarto, o coração era rapidamente removido do Langendorff, e permanecia por um período de 1 h em freezer (-20° C) para permitir que cortes transversais (2 mm de espessura) fossem realizados. Em seguida, os cortes eram incubados em solução tamponada (pH 7,4) de cloreto de trifeniltetrazolium (TTC) a 37 °C por 20 min. O TTC reage com o NADH e as enzimas desidrogenases presentes nos tecidos viáveis, de forma que essa reação leva ao aparecimento de uma coloração vermelha. Durante a reperfusão, ocorre “wash out” da região isquêmica, o que leva a retirada do NADH e das enzimas desidrogenases das células mortas, fazendo com que não haja coloração nessa área infartada, permanecendo pálida. Após a coloração com TTC, os cortes eram imersos em solução de formalina 10% durante 30 min para permitir maior contraste entre as diferentes regiões.

Finalmente, os cortes eram colocados em uma mesa de acrílico e coberta por um tampo de vidro a fim de uniformizar a espessura dos cortes e permitir que os mesmos fossem digitalizados. Como demonstrado na figura 3.6, a área total de infarto foi medida através de planimetria e analisada pelo “software Image J 1.29” (National Institute of Health, EUA), por um observador que não tinha ciência de qual grupo cada imagem pertencia. A área total de infarto foi então expressa como um percentual da área total do VE.

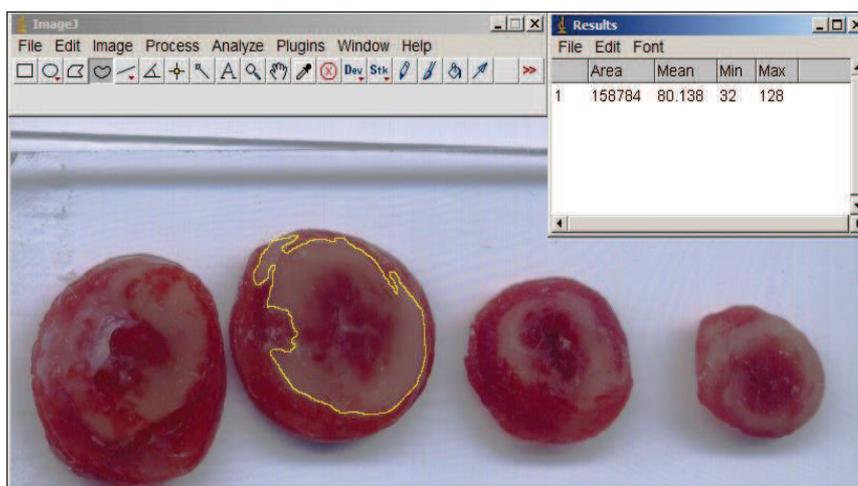


Figura 3.6: Figuras representativas da determinação da área do infarto realizada através do “Image J”, após cortes terem sido corados com TTC.

3.6 Verificação do Efeito Cardioprotetor do Exercício e a Participação do Sistema Opióide em Modelo de IR *in vivo*

Protocolo Experimental

Para verificar o efeito cardioprotetor do exercício e a participação do sistema opióide em modelo de IR *in vivo*, os ratos foram divididos em 2 grupos: grupo controle e grupo exercício. Sendo que o grupo controle foi subdividido em:

- 1) Grupo controle submetido a IR (CT; n=10);
- 2) Grupo controle submetido a cirurgia *sham*, ou seja, indução de IR fictícia (CT *sham*; n=10);
- 3) Grupo controle submetido a IR e infusão de naloxona (3 mg/kg, iv.), 10 min antes da isquemia (CT+N; n=10).

Enquanto o grupo exercício foi subdividido em:

- 1) Grupo submetido a exercício físico e IR (Exe; n=10);
- 2) Grupo submetido a exercício físico, IR e infusão de naloxona (3 mg/kg, iv.) 10 min antes da isquemia (Exe+N; n=10).

A figura 3.7 ilustra a divisão dos grupos:

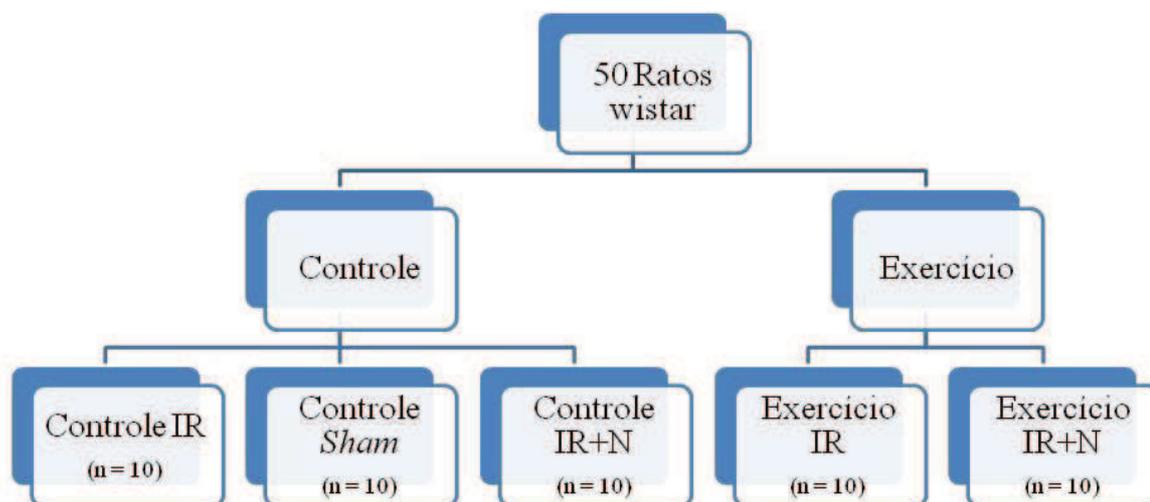


Figura 3.7: Divisão dos grupos experimentais no modelo de isquemia reperfusão *in vivo*.

Procedimentos Cirúrgicos

Na semana seguinte ao período de treinamento ou de confinamento, os ratos foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos para indução de IR. Inicialmente os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (70 mg/kg, ip.); em seguida traqueostomizados com uma cânula de polietileno tamanho 14, e ventilados mecanicamente em volume corrente de 10 ml/kg; frequência respiratória de 40 a 50 incursões/min em respirador mecânico (Rodent Ventilator 7025, Ugo Basile, Varese, Itália). A temperatura corporal dos animais era mantida através da utilização de unidade homeotérmica (Harvard Apparatus, UK) que, com o uso de termômetro retal e colchão térmico, mantinha a temperatura do animal entre 37 e 37,5 °C. Artéria femoral e veia jugular foram canuladas com tubos de polietilenos (PE- 10 e 50), respectivamente, para registro da PA, FC e injeção de drogas, respectivamente.

Para indução de lesão de IR miocárdica, foi utilizada ligadura coronariana reversível. Para tal, era feita uma toracotomia lateral, através de incisão à esquerda do esterno e paralela às quarta e quinta costelas, as quais foram separadas com um afastador de tórax para visualização do coração. Depois que a artéria coronária esquerda era visualizada, era realizada

pericardiotomia e ligadura da mesma, cerca de 1 mm de sua origem, utilizando-se fio de sutura de polietileno 6.0. Para obter um oclisor, as pontas do fio de sutura eram passadas por dentro de um tubo de polietileno (PE-50). Dessa forma, a oclusão arterial era obtida ao empurrar o tubo contra a superfície do coração e prendendo-o nessa posição com o uso de uma pinça hemostática pequena. A isquemia era confirmada por alterações no segmento ST do eletrocardiograma (ECG) e o aparecimento de cianose na região epicárdica correspondente ao ramo ocluído. A reperfusão era feita soltando a pinça hemostática, e confirmada pelo fim da cianose e o aparecimento de hiperemia reativa. Esse procedimento de isquemia regional e reperfusão visa gerar uma área de isquemia (área sob risco) com uma área de infarto central (Figura 3.8).

A oclusão coronariana foi mantida por 30 minutos, período este que já foi demonstrado ser suficiente para causar lesão isquêmica irreversível [12], e o período de reperfusão foi de 60 minutos.

Os grupos CT+N e Exe+N, receberam o antagonista de receptor opióide não-seletivo, ou seja, naloxona (3 mg/Kg, iv.), 10 min antes da isquemia.

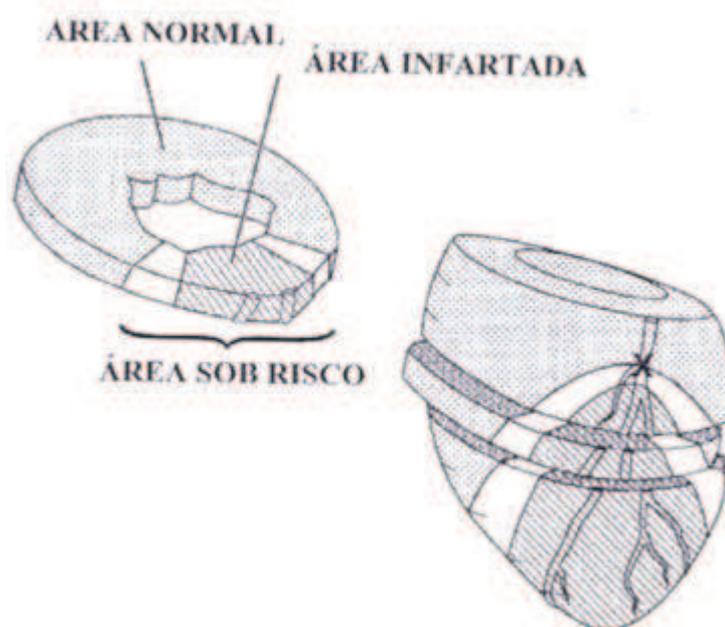


Figura 3.8: Representação esquemática da lesão tecidual decorrente dos efeitos da ligadura coronariana reversível.

Medidas Hemodinâmicas

A cânula da artéria femoral foi conectada a um transdutor de pressão (Modelo TSD104A, BIOPAC Systems, Goleta, CA) e os sinais de pressão foram canalizados através de um amplificador de sinal (Modelo DA100C, BIOPAC Systems, Goleta, CA). Os dados foram coletados com taxa amostral de 1.000 amostras / seg, através do MP 150 system (BIOPAC Systems, Goleta, CA) e gravados durante todo o experimento usando o “software *AcqKnowledge 3.7.3*” (BIOPAC Systems, Goleta, CA). Os dados coletados foram analisados para quantificar mudanças na PA.

A atividade elétrica cardíaca foi monitorada continuamente (em derivação periférica DII), através da implantação de 3 eletrodos (agulhas) no tecido subcutâneo. Os sinais analógicos de ECG foram digitalizados com uma frequência de coleta de 1 Hz e gravados em computador para posterior análise através do “AcqKnowledge 3.7.3” (BIOPAC Systems, Goleta, CA).

Determinação da Área de Infarto

Ao término do período de reperfusão, com o intuito de demarcar a área de risco (isquêmica), o ramo coronariano foi novamente ocluído, e o coração foi perfundido com azul de Evans (1%) através do cateter da artéria femoral. A partir daí a metodologia era exatamente a mesma realizada no objetivo anterior (tópico 3.5). A área total de infarto foi expressa com um percentual da área de risco do VE.

3.7 Verificação da Influência da Participação de Outros Potenciais Mecanismos na Cardioproteção Induzida pelo Exercício

Análise Histológica do Ventrículo Esquerdo

Para análise de densidade capilar estrutural (DCE), amostras de tecido de VE do grupo exercitado (Exe; n = 5) e controle (CT; n = 5) foram fixadas em “Milloning”, e cortadas usando o método “orientator”, que já foi previamente descrito [120]. Esse método implica em realizar cortes isotrópicos uniformes na amostra, cortando os fragmentos em três vezes consecutivas. O primeiro corte é aleatório, o segundo é ortogonal ao primeiro, e o terceiro é ortogonal ao segundo. Em seguida, os cortes foram desidratados em uma série graduada de etanol (70, 95 e 100%) e emblocados em parafina.

Os blocos de parafina foram então cortados em sessões de 5 μm com auxílio de um micrótomo (Leica, RM 2125, Alemanha) e fixados em lâminas para posteriormente serem coradas por 30 min com lectina *Griffonia simplicifolia* acoplada à fluoresceína-isotiocianato (FITC; diluição 1:150), em sala escura em temperatura ambiente.

Para cada rato, foram examinados, pelo menos, cinco campos microscópicos aleatórios, em três diferentes secções do tecido. As amostras foram visualizadas através de um microscópio de fluorescência (Olympus BX50/WI, EUA) acoplado a um sistema de câmera de vídeo digital (Optronics, Goleta, CA, EUA). Eram feitas cinco fotos representativas do campo microscópico para contagem, através do “software Archimed 3.7.0” (Microvision, França), com aumento de 200x no monitor. A DCE foi contada por um observador que não tinha ciência do grupo ao qual pertencia cada imagem, e calculada dividindo-se o número de capilares pelo número de fibras encontradas nas imagens (V_v [capilares] / V_v [fibras]).

Western Blotting Para Expressão do VEGF

Para análise da expressão proteica do VEGF foi utilizado *western blotting*, do grupo Exe (n = 5) e CT (n = 5). Para tal, o coração era rapidamente removido, e o VE cuidadosamente dissecado e separado do restante do coração com ajuda de uma lupa cirúrgica. As amostras eram então lavadas em solução fisiológica gelada, e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido, e guardadas a -70°C para posterior análise.

Na análise, os tecidos isolados foram homogeneizados por sonicação em tampão de lise gelado (4°C) contendo 0,4 mol/L de NaCl, 0,05% de Tween 20, 2 mM de fenilmetilsulfonil fluoridro (PMSF) em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 0,88 mM, Na_2HPO_4 6,4 mM, pH 7,4) acrescido de inibidores de protease e fosfatases. A concentração de proteínas dos extratos foi determinada pelo método RC DC (500-0122 RC DC Protein Assay Kit II; Bio Rad), utilizando albumina bovina sérica (BSA) como padrão.

Amostras de 100 μg de proteína foram diluídas em tampão de amostra composto por Tris-HCl 80mM pH 6,8; SDS 2%; glicerol 12%; β mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,05%, submetidas à ação do temperatura de 100°C por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida 10% com SDS. Após eletroforese, as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech) e bloqueadas com leite 5% (Molico) diluído em TBS (NaCl 137 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,4) por 1 hora em temperatura ambiente. O anticorpo primário contra o VEGF (1:250, Santa Cruz Biotechnology) foi incubado na membrana de nitrocelulose “overnight” a 4°C e o anti Actina (1:200, Santa Cruz Biotechnology) por 2h em temperatura ambiente. Após lavagem em TBS-

T (solução de TBS com 0,1% Tween 20), as membranas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com os anticorpos secundários conjugados a peroxidase (1:10.000 anti-mouse, e 1:20.000 anti-rabbit; Pierce Biotechnology; respectivamente). Todos os anticorpos foram diluídos em leite 5% em TBS.

Os anticorpos secundários foram detectados pelo sistema de quimioluminescência, utilizando-se o “kit Super Signal West Pico” (Pierce Biotechnology) em filmes de raios-x (GE Healthcare), e revelados em solução reveladora e fixadora Kodak. Após a revelação e secagem dos filmes, a densitometria das bandas foi quantificada com auxílio do “software Image J 1.29” (National Institute of Health, EUA). A membrana de nitrocelulose foi corada com “rouge ponceau” para controle de carregamento.

RT-PCR quantitativo

Os níveis da expressão de ácido ribonucleico (.RNA) mensageiro (RNAm) dos genes para as seguintes enzimas antioxidantes foram medidos: EcSOD, Cu,ZnSOD, MnSOD e CAT. Além destas, também foi medida a HSP 72. Para tal, foi realizada reação de cadeia da polimerase (PCR – “polymerase chain reaction”) quantitativo em tempo real (RT-PCR) utilizando-se amostras do VE dos animais dos grupos exercitados (Exe; n = 3) e controle (CT; n = 5). Portanto, após a reperfusão, o coração foi rapidamente removido, o VE cuidadosamente dissecado e separado do restante do coração com ajuda de uma lupa cirúrgica. Essas amostras foram lavadas em solução fisiológica gelada, e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido, e guardadas a -70 °C para posterior análise.

Na análise, o RNA total foi extraído a partir de 30 mg do VE utilizando o *kit RNeasy® Fibrous Tissue* (Qiagen, EUA), seguindo o protocolo determinado pelo fabricante. A quantificação dos níveis de RNA total foi determinada medindo a absorbância da amostra a 260nm (A_{260}) em espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA).

Em seguida, 1 µg do RNA total foi transcrito em DNA complementar (cDNA) usando o kit “High Capacity cDNA Reverse Transcriptase” (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as orientações do fabricante. Para determinação dos níveis de expressão gênica as reações foram feitas em placas de 96 poços (Applied Biosystems, EUA) com um volume final de 25 µl, contendo 1µl de cDNA (diluído 10x), 12,5 µl de 2X “Power SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, EUA) e 150 nM de cada “primer” (Invitrogen, EUA) “forward” e “reverse” (Tabela 3.1) e corridas no aparelho “ViiA™ 7 Real Time PCR System” (Life Technologies, EUA). O programa de amplificação utilizado foi: 50°C por 2 min, 95°C

por 10 min, e 40 ciclos de 95°C por 15 seg seguido de 60°C por 1 min. A especificidade dos “primers” foi confirmada por análise das curvas de “melting”. Todas as amostras foram corridas em duplicata e cada respectivo controle negativo de reação sem DNA foi realizado em paralelo. A expressão de cada gene foi normalizada pela β -actina. A quantidade relativa da expressão de RNAm de cada gene específico foi determinada usando o método comparativo de CT, expresso pela seguinte equação: $2^{-\Delta CT}$ [121], onde CT se refere ao limiar do ciclo (“threshold cycle”), determinado para cada poço pelo “ViiA™ 7 software” (Life Technologies, EUA). Levando em conta que ΔCT é o CT do seu RNAm alvo menos o CT do controle endógeno (β -actina).

Tabela 3.1: “Primers” utilizados para análise de expressão gênica através de RT-PCR.

<i>Alvo</i>		<i>Sequência do Primer</i>
EcSOD	Forward	GGCCAGCTCCAGACTGA
	Reverse	CTCAGGTCCCCGAACTCATG
Cu,ZnSOD	Forward	CGGCTTCTGTCGTCTCCT
	Reverse	G TTCACCGCTTGCCTTCT
MnSOD	Forward	TTAACGCGCAGATCATGCA
	Reverse	CCTCGGTGACGTTTCAGATTGT
Catalase	Forward	ACTCAGGTGCGGACATTC
	Reverse	GGAGTTGTA CTGGTCCAGAAGAGCC
HSP72	Forward	GCTCATCAAGCGCAACTCCAC
	Reverse	TCGTACACCTGGATCAGCACCC
β -actina	Forward	CCACCCGCGAGTACAACCTTCTT
	Reverse	GAAGCCGGCCTTGCACATGCC

3.8 Investigação do Envolvimento de Cada Tipo de Receptor Opióide na Cardioproteção Induzida pelo Exercício

Protocolo Experimental Para Bloqueio Farmacológico

Para atingir o terceiro objetivo, os ratos foram divididos em 3 grupos:

- 1) Grupo submetido a exercício físico, IR e infusão de naltrindole (3 mg/kg, iv.), um antagonista seletivo de receptores delta (Exe + D; n=5);
- 2) Grupo submetido a exercício físico, IR e infusão de nor-binalthorhimina (3 mg/kg, iv.), um antagonista seletivo de receptores kappa (Exe + K; n=5);
- 3) Grupo submetido a exercício físico, IR e infusão de β -funaltrexamina (3 mg/kg, iv.), um antagonista seletivo de receptores mu (Exe + M; n=5).

Após a divisão em grupos, os animais passaram pelos mesmos procedimentos descritos nas seções anteriores de Procedimentos Cirúrgicos, Medidas Hemodinâmicas e Determinação da Área de Infarto, do tópico 3.6. Sendo que todos os grupos receberam seus respectivos antagonistas de opióides 10 min antes da isquemia.

Western Blotting Para Expressão dos Subtipos de Receptores Opióides

Para medir a expressão proteica dos diferentes tipos de receptores opióides (μ , κ e δ) foi utilizado western blotting. Devido a essa questão estar diretamente relacionada ao objetivo principal do trabalho, foram feitas duas diferentes análises dos grupos Exe e CT: com e sem a indução da lesão por IR. Apesar de já ter sido descrita a técnica de western blotting no tópico 3.7, a metodologia específica utilizada para mensuração da expressão dos receptores opióides foi ligeiramente distinta da realizada para expressão do VEGF. Isso se deu em função de ser tratar de diferentes anticorpos, que implicam em pequenas modificações no protocolo. Portanto, faz-se necessário descrever aqui as especificações do western blotting para expressão dos receptores opióides.

Para a análise, os tecidos de VE isolados foram homogeneizados (por 2 minutos, a 1745 rpm em agitador mecânico RW20 Digital IKA) em tampão de lise gelado (4° C) contendo 250 mM de sacarose, 1 mM de imidazole, pH 7,6 (ajustado com Tris), 1 mM de EDTA e 0,05 g de inibidor de tripsina. O extrato foi então centrifugado por 15 minutos, a 3500 rpm (rotor SS34, centrífuga SORVALL RC-5B). O sobrenadante foi recolhido e centrifugado por 1 hora, a 32900 rpm (rotor 70 Ti, centrífuga Beckman Coulter) (modificado de Dostanic et al., 2004 [122]). O precipitado desta segunda centrifugação foi ressuspendido em 1 ml da solução de homogeneização inicial e congelado a -20°C em alíquotas para posterior dosagem.

A concentração de proteínas dos extratos foi determinada por método colorimétrico modificado de Lowry [123], utilizando reagente de Folin-Fenol, SDS 2,5% e BSA como padrão. Amostras de 60 μ g de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% com SDS. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech), e bloqueadas com leite 5% (Molico) diluído em TBS “overnight” a 4°C e então incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com os anticorpos primários contra os tipos de receptores opióides μ (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), κ (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) e δ (1:1500, Santa Cruz Biotechnology) diluídos em leite 5% em TBS. Após lavagem em TBS-T, as membranas de nitrocelulose foram incubadas por 1 hora em solução (leite 5% em TBS) com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (1:5000 anti-rabbit, Amersham GE Healthcare). Os anticorpos

secundários foram detectados pelo sistema de quimioluminescência (ECL, GE Healthcare) em hiperfilme (GE Healthcare) e revelados em solução reveladora e fixadora Kodak. Após a revelação e secagem dos filmes, a densitometria das bandas foi quantificada com auxílio do “software” específico (Scion Co, Frederick, MD, EUA). A membrana de nitrocelulose foi corada com “rouge ponceau” para controle de carregamento.

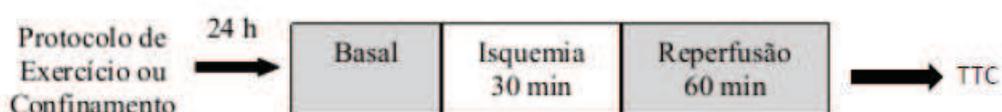
3.9 Drogas

Naloxona, naltrindole, β -funaltrexamina, nor-binalthorphimina foram obtidas da Tocris Bioscience (Minneapolis, MN, EUA). O TTC, pentobarbital sódico e Azul de Evans foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

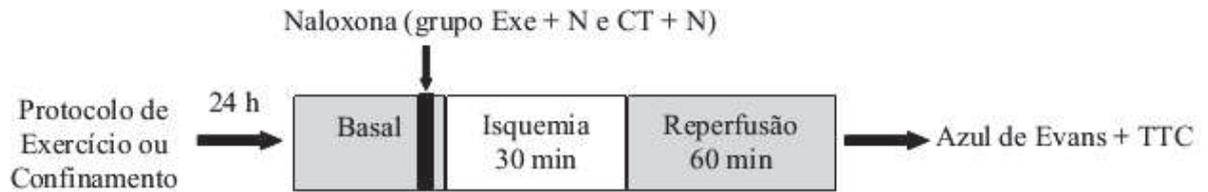
3.10 Representação Esquemática

Abaixo encontram-se os esquemas organizacionais de acordo com os objetivos específicos.

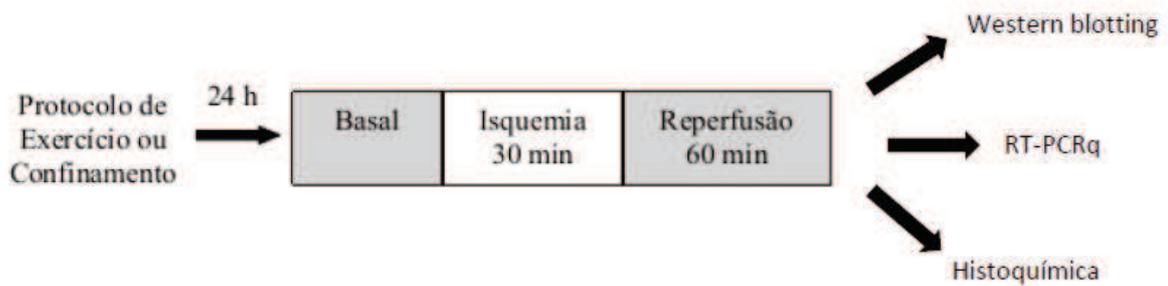
Verificar efeito cardioprotetor do exercício e a participação do sistema opióide em modelo de IR *ex vivo*



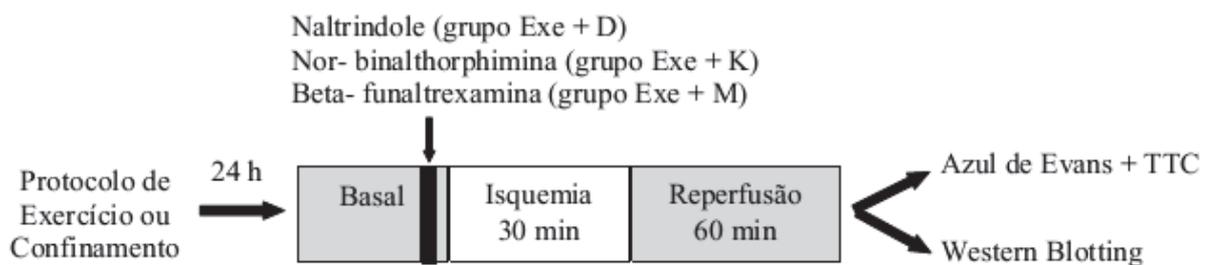
Verificar efeito cardioprotetor do exercício e a participação do sistema opióide em modelo de IR *in vivo*



Verificar influência da participação de outros potenciais mecanismos na cardioproteção induzida pelo exercício



Investigar envolvimento de cada tipo de receptor opióide (Mu, Delta e Kappa) na cardioproteção induzida pelo exercício



3.11 Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. A normalidade da distribuição dos dados foi determinada através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As medidas hemodinâmicas foram analisadas através de Análise de Variância (ANOVA) de duas entradas, seguida de post-hoc de Bonferroni. Os resultados para área de infarto foram tratados por ANOVA de uma entrada, seguida de post-hoc de Bonferroni. Já os resultados do RT-PCR, western blotting e de DCE foram analisados por teste t. Para todas as análises foi fixado nível significativo de $P < 0,05$. Todos os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do “Graphpad Prism” (Graphpad Software, San Diego, CA).

4 Resultados

4.1 Padrões Histológicos

Abaixo encontra-se figura representativa do padrão histológico obtido do VE após corte e coloração com TTC e Azul de Evans.

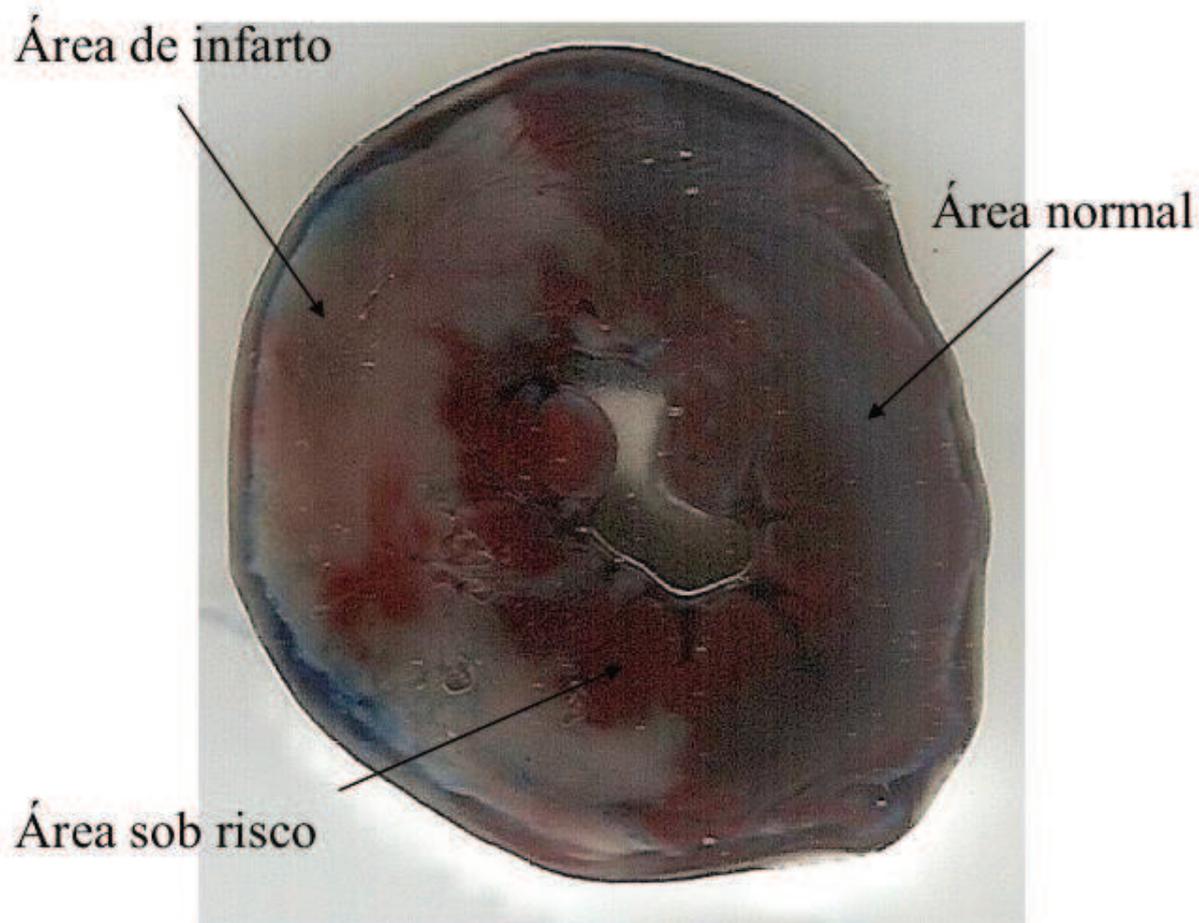


Figura 4.1: Identificação das diferentes regiões de um corte de ventrículo esquerdo pela técnica de azul de Evans e TTC.

4.2 Capacidade Máxima de Exercício

Para determinação da velocidade de corrida de cada animal durante as 4 sessões de exercício correspondente a 70% do $VO_{2máx}$, foi realizado um teste incremental máximo. Portanto, como pode ser visto na tabela 4.1, o tempo de exercício até a exaustão, a velocidade máxima alcançada durante o teste, a distância máxima percorrida e o $VO_{2máx}$ foram avaliados em todos os grupos experimentais antes do início das sessões de exercício físico ou confinamento. Como esperado, não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos nas variáveis obtidas no teste.

Tabela 4.1: Variáveis obtidas nos testes para determinação da capacidade máxima em todos os grupos experimentais.

	CT	CT sham	CT + N	Exe	Exe + N	Exe + D	Exe + M	Exe + K
Número amostral	14	10	10	14	14	5	5	5
Tempo de Exaustão (min)	23,5 ± 0,8	25,1 ± 1,5	23,0 ± 0,9	22,5 ± 0,8	23,7 ± 0,9	24,1 ± 1,3	24,0 ± 0,9	23,8 ± 1,1
Velocidade Máxima (m/min)	31,5 ± 0,6	33,5 ± 1,3	31,5 ± 0,7	31,5 ± 0,6	32,8 ± 0,8	32,2 ± 0,9	32,8 ± 1,0	31,6 ± 0,8
Distância percorrida (m)	528,8 ± 24,5	538,0 ± 37,3	464,5 ± 26,8	450,8 ± 28,4	508,0 ± 24,9	491,3 ± 29,3	520,3 ± 32,1	516,8 ± 28,4
VO ₂ ^{máx} (ml/Kg/min)	59,4 ± 1,2	60,4 ± 1,8	56,8 ± 0,7	57,1 ± 1,2	56,5 ± 0,9	58,3 ± 1,4	58,7 ± 1,9	55,6 ± 1,1
Velocidade a 70% do VO ₂ ^{máx} (m/min)	22,7 ± 0,3	23,2 ± 0,6	22,0 ± 0,4	22,1 ± 0,3	22,1 ± 0,5	22,4 ± 0,6	22,4 ± 0,7	21,8 ± 0,3

4.3 Efeito Cardioprotetor do Exercício e a Participação do Sistema Opióide em Modelo de IR *ex vivo*

Medidas Hemodinâmicas

O grupo Exe apresentou PDVE significativamente maior que o grupo Exe+N e CT a partir de 60 e 55 min, respectivamente (Figura 4.2). Além disso, o resultado para a PDF e a P min do grupo Exe foi significativamente menor comparado ao obtido no grupo CT (Tabela 4.2). No entanto, os valores para P máx, dP/dt Máx e dP/dt Min não foram diferentes entre os grupos. É importante ressaltar que não houve diferença entre os grupos no período basal, como pode ser observado na tabela 4.2.

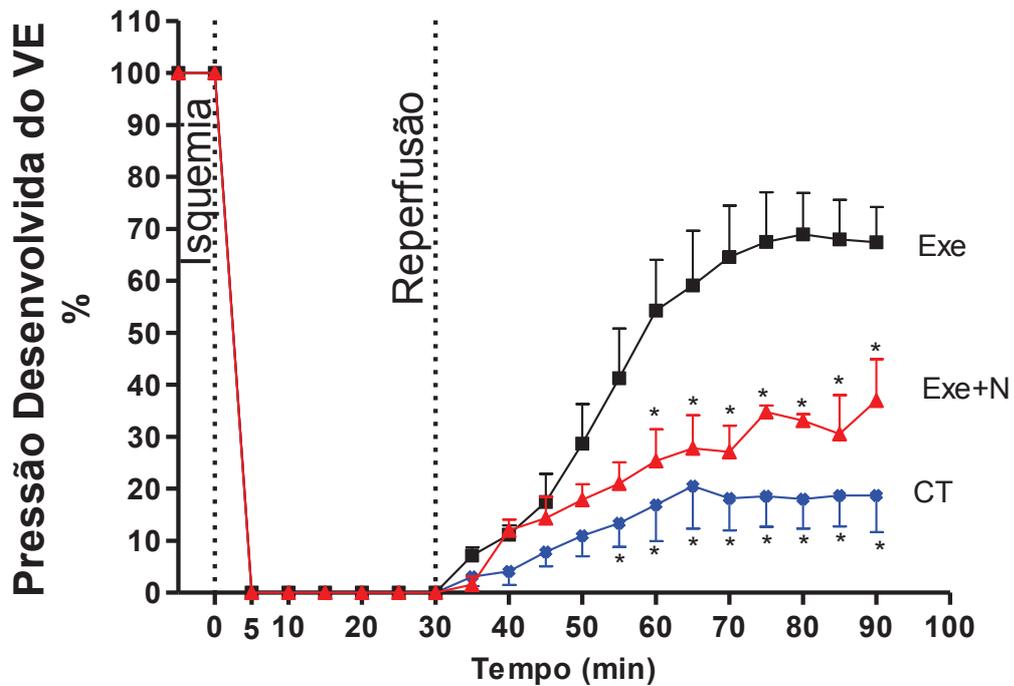


Figura 4.2: Percentual da pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo (VE) durante a lesão por isquemia e reperfusão em Langendorff dos grupos exercitado (Exe; n = 4), exercitado submetido a bloqueio não – seletivo do receptores opióides (Exe + N; n = 4) e controle (CT; n = 4). * P < 0,05 vs Exe

Tabela 4.2: Função cardíaca antes e após isquemia-reperfusão em Langendorff nos grupos experimentais.

		CT	Exe	Exe + N
PDVE	Pré	103,8 ± 2,1	105,6 ± 4,2	93,9 ± 11,6
	Pós	27,1 ± 5,3	72,0 ± 8,4*	42,3 ± 7,8
	Δ	-76,6	-33,6	-51,6
PDF	Pré	12,6 ± 0,7	12,2 ± 0,7	14,4 ± 0,8
	Pós	85,0 ± 4,2	57,5 ± 5,6*	61,6 ± 3,3
	Δ	72,4	45,3	47,1
P min	Pré	10,6 ± 0,4	7,6 ± 0,4	11,7 ± 1,0
	Pós	83,0 ± 4,3	50,8 ± 5,5*	57,6 ± 2,8
	Δ	72,8	43,1	45,8
P máx	Pré	113,9 ± 1,7	113,3 ± 4,0	105,6 ± 11,1
	Pós	110,1 ± 0,9	122,8 ± 3,1	99,9 ± 9,7
	Δ	-3,7	12,5	-5,7
dP/dt máx	Pré	3065,2 ± 86,0	2642,3 ± 122,8	3658,8 ± 533,6
	Pós	1154,7 ± 141,3	1912,2 ± 249,7	1568,4 ± 136,2
	Δ	-1910,4	-730,1	-2090,3
dP/dt min	Pré	-2289,7 ± 60,1	-2011,0 ± 70,4	-2434,8 ± 257,3
	Pós	-951,3 ± 59,1	-1475,9 ± 154,5	-1229,5 ± 76,0
	Δ	1338,4	535,1	1205,2

* P < 0,05 vs CT pós; média ± EPM; CT - grupo controle (n = 4); Exe - grupo exercício (n = 4); Exe+N - grupo exercício + naloxona (n = 4); PDVE - pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo (mmHg); PDF - pressão diastólica final (mmHg); P min - pressão mínima (mmHg); P máx - pressão máxima (mmHg); dP/dt Max - variação de pressão máxima ventricular em função do tempo; dP/dt Min - variação de pressão mínima ventricular em função do tempo.

Determinação da Área de Infarto

Como demonstrado na figura 4.3, o grupo Exe apresentou menor área de infarto comparado ao grupo CT ($11,3 \pm 4,0\%$ vs $37,3 \pm 9,2\%$; respectivamente). O tratamento com o antagonista não-seletivo de opióide bloqueou parcialmente o efeito cardioprotetor do exercício, pois o grupo Exe + N ($28,1 \pm 8,0\%$) apresentou maior área de infarto em relação ao Exe.

Na figura 4.4, é possível observar figuras representativas de cortes de VE de cada grupo experimental após coloração com TTC. Como descrito na metodologia, a região pálida observada nos cortes representa a área infartada.

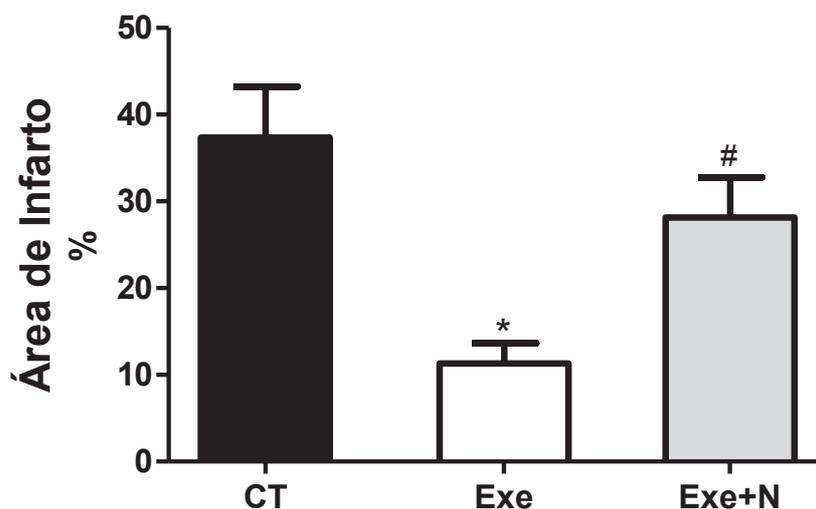


Figura 4.3: Área de infarto após lesão por isquemia e reperfusão no Langendorff nos grupos controle (CT; n = 4), exercitado (Exe; n = 4) e exercitado submetido a bloqueio não - seletivo dos receptores opióides (Exe + N; n = 4). * p < 0,01 vs CT; # P < 0,05 vs Exe

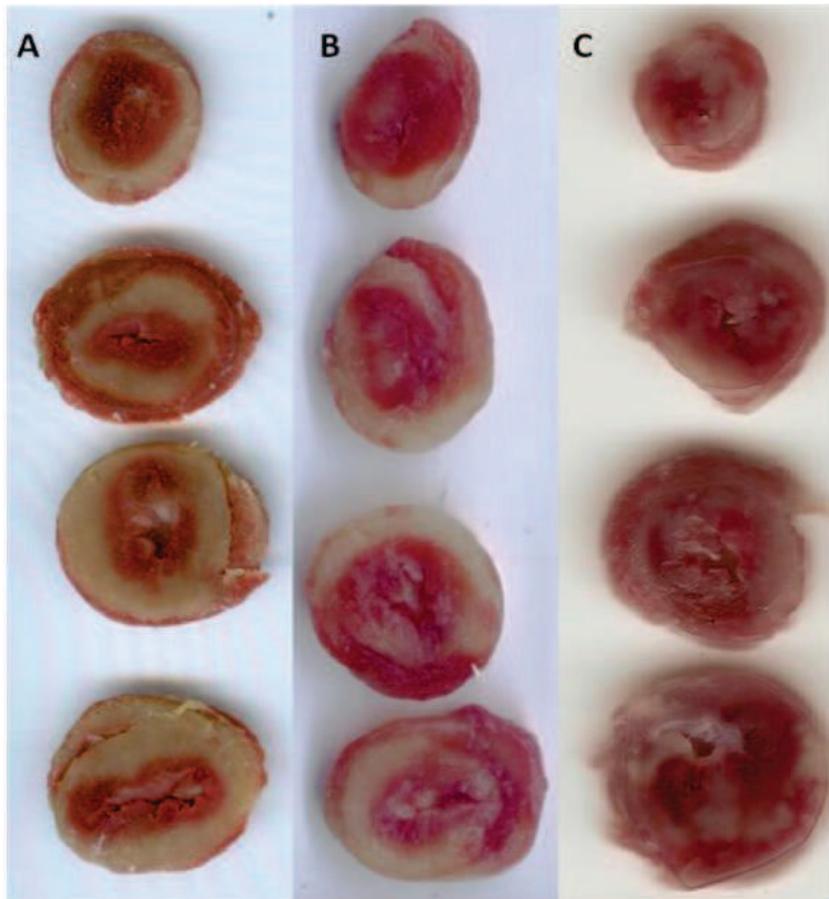


Figura 4.4: Figuras representativas de cortes realizados no coração após coloração com TTC do grupo controle (A), exercitado submetido a bloqueio não – seletivo dos receptores opióides (B) e exercitado (C).

4.4 Efeito Cardioprotetor do Exercício e a Participação do Sistema Opióide em Modelo de IR *in vivo*

Medidas Hemodinâmicas

Como pode ser observado na figura 4.5, os grupos experimentais não apresentaram diferença entre eles no basal para nenhum parâmetro hemodinâmico analisado. Não foram encontradas diferenças entre os grupos Exe, Exe+N e CT Sham para nenhuma resposta hemodinâmica, o que indica que os grupos que se exercitaram (Exe e Exe+N) foram capazes de manter os valores pressóricos durante todo o experimento.

Diferentemente dos grupos CT e CT+N que apresentaram pressão arterial sistólica (PAS), média (PAM) e diastólica (PAD) significativamente menor comparado ao grupo Exe ao final dos 30 min de isquemia. Em adição, o grupo CT+N também apresentou resultado significativamente menor para a PAS, PAM e PAD comparado aos grupos CT Sham e Exe+N ao final de 30 min de isquemia. E já ao final da reperfusão, o grupo CT apresentou menor PAS em relação ao CT Sham.

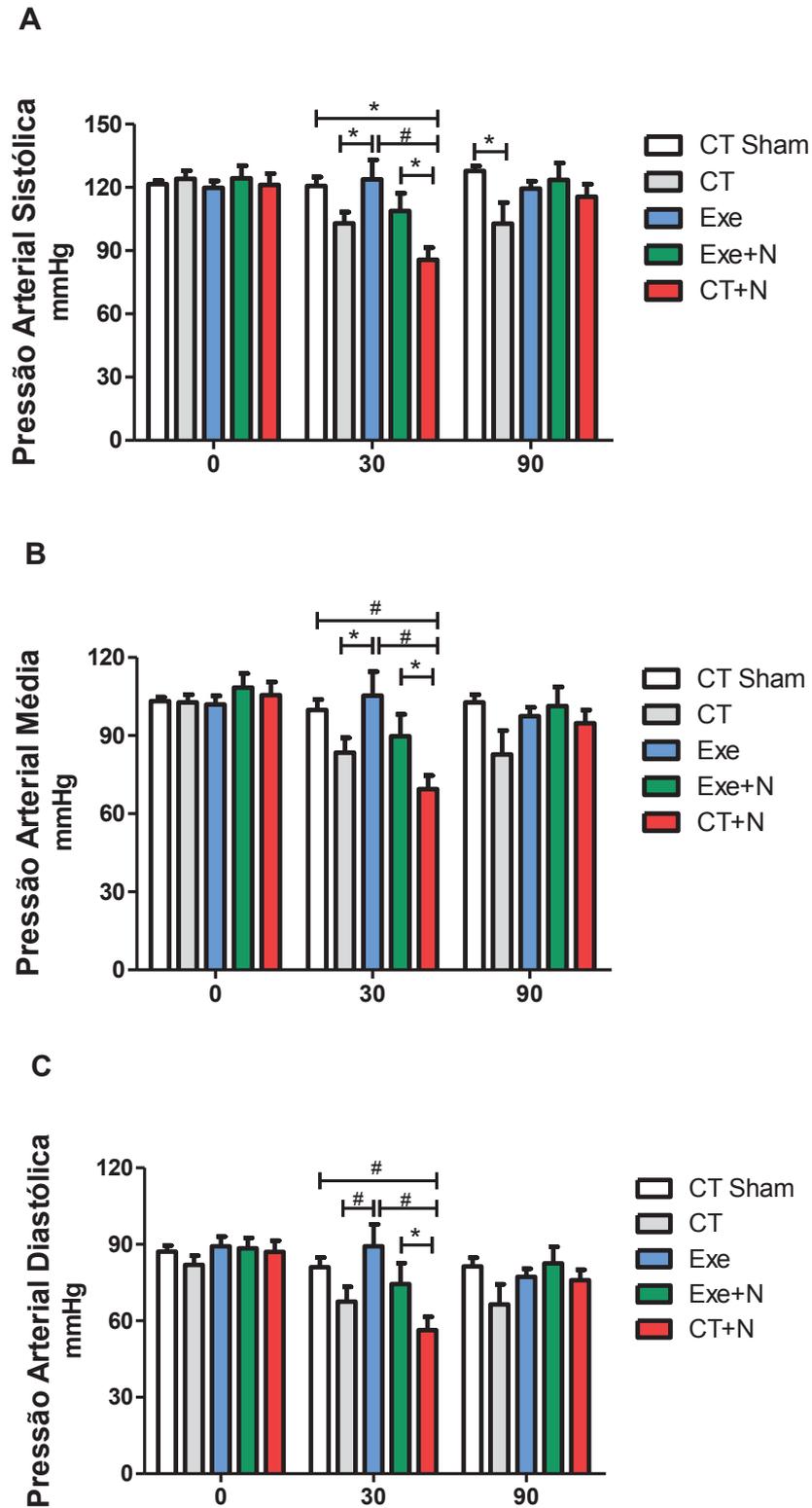


Figura 4.5: Pressão arterial sistólica (A), média (B) e diastólica (C) do modelo in vivo no período basal (0 min), ao final da isquemia (30 min) e reperfusão (90 min) dos grupos controle sham (CT Sham; n = 10), controle (CT; n = 10), exercitado (Exe; n = 10), exercitado submetido a bloqueio não – seletivo dos receptores opióides (Exe + N; n = 10).

= 10) e controle submetido a bloqueio não – seletivo dos receptores opióides (CT + N; n = 10). * P < 0,05; # P < 0,01

Determinação da Área de Infarto

Como esperado, o grupo CT Sham não apresentou área de infarto. O grupo Exe apresentou área de infarto significativamente menor comparado aos demais grupos (Figura 4.6). O tratamento com o antagonista não-seletivo de opióide, a naloxona, bloqueou o efeito cardioprotetor do exercício, uma vez que o grupo Exe + N não apresentou diferença em relação aos grupos CT e CT+N. No entanto quando a naloxona foi administrada sem a associação do exercício (grupo CT+N) a área de infarto não foi diferente do grupo CT, o que indica que a naloxona por si só não foi capaz de influenciar na resposta obtida, e sim o exercício.

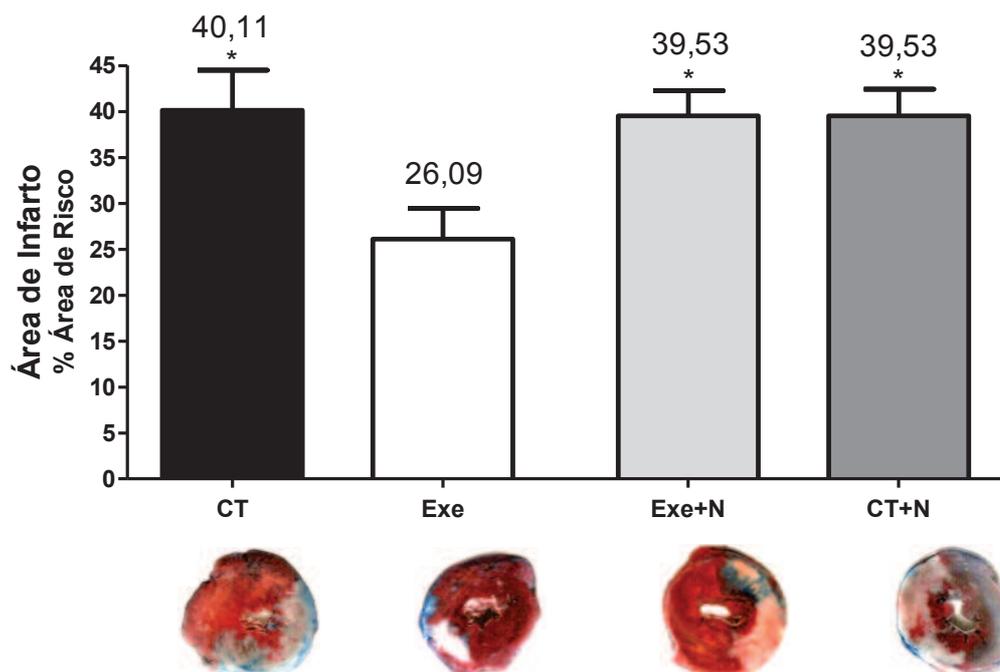


Figura 4.6: Área de infarto observada após lesão por isquemia e reperfusão no modelo in vivo nos grupos controle (CT; n = 10), exercitado (Exe; n = 10), exercitado submetido a bloqueio não – seletivo dos receptores opióides (Exe + N; n = 10) e controle submetido a bloqueio não – seletivo dos receptores opióides (CT + N; n = 10).

* P < 0,05 vs Exe

4.5 Outros Potenciais Mecanismos na Cardioproteção Induzida Pelo Exercício

Densidade Capilar Estrutural

A figura 4.7 confirma que o protocolo de exercício realizado com 4 sessões consecutivas não foi suficiente para promover aumento na DCE, uma vez que o grupo Exe ($0,22 \pm 0,01 V_{V[\text{cap}]} / V_{V[\text{fib}]}$) apresentou resultado semelhante ao observado no CT ($0,21 \pm 0,01 V_{V[\text{cap}]} / V_{V[\text{fib}]}$).

Na figura 4.8 encontra-se uma imagem representativa obtida para avaliação histológica de DCE com lectina.

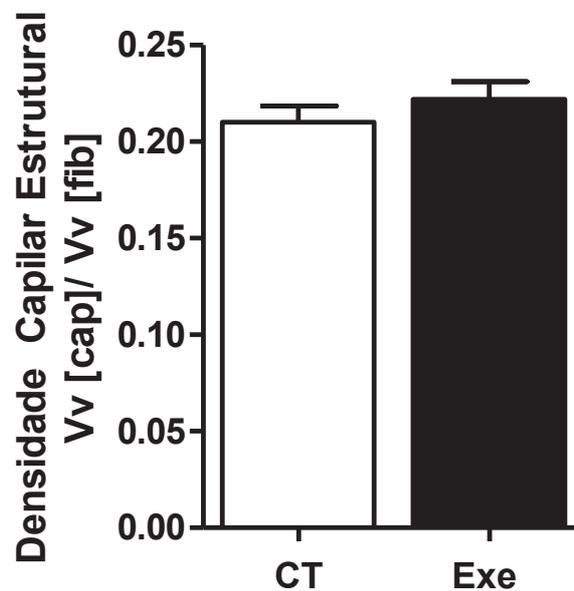


Figura 4.7: Efeito do protocolo de exercício físico utilizado sobre a densidade capilar estrutural no ventrículo esquerdo no grupo controle (CT; n = 5) e exercitado (Exe; n = 5).

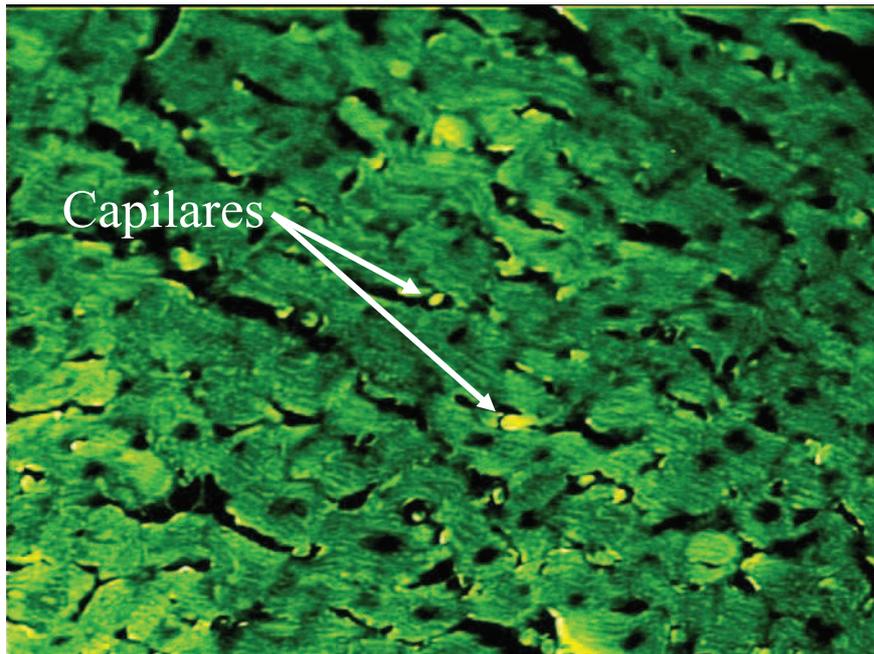


Figura 4.8: Imagem representativa de fotomicrografia adquirida utilizando microscopia de fluorescência para avaliação histológica de densidade capilar estrutural com lectina *Griffonia simplicifolia* acoplada ao FITC. O arranjo anatômico da rede capilar do ventrículo esquerdo pode ser observado com aumento de 200x.

Expressão do VEGF

Para análise da expressão proteica do VEGF foi utilizado western blotting, do grupo Exe (n = 5) e CT (n = 5).

Conforme mostra a figura 4.9, a expressão do VEGF nos grupos Exe e CT não foi estatisticamente diferente (Exe: $0,75 \pm 0,23$ vs. CT: $0,81 \pm 0,08$ u.a.; $p > 0,05$).

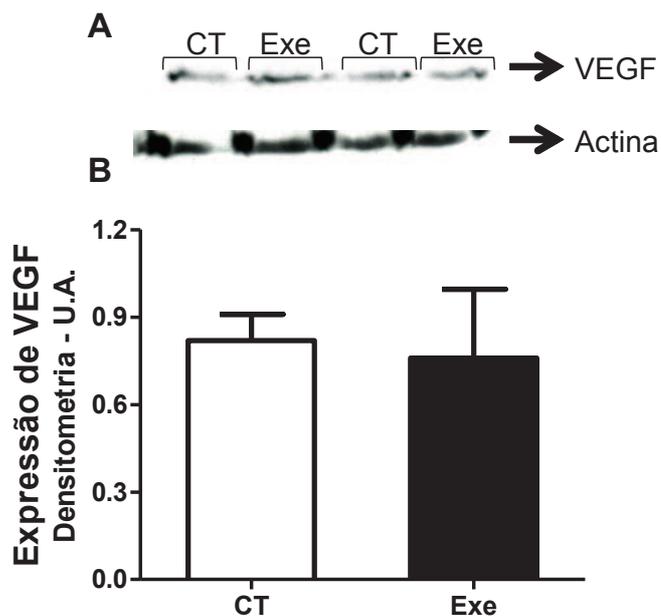


Figura 4.9: Expressão do VEGF no ventrículo esquerdo dos grupos controle (CT; n = 5) e exercitados (Exe; n = 5). Immunoblots representativos dos grupos CT e Exe para VEGF e Actina (A). Os gráficos representam a expressão do VEGF normalizados por Actina (B). u.a. unidades arbitrárias.

Expressão Gênica da Capacidade Antioxidativa e da HSP 72

Os resultados para a expressão gênica das enzimas antioxidantes EcSOD, Cu,ZnSOD, MnSOD e CAT do grupo Exe foram $1,07 \pm 0,86$ x controle, $0,94 \pm 0,18$ x controle, $0,93 \pm 0,19$ x controle e $1,13 \pm 0,38$ x controle; respectivamente (figura 4.10). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos para nenhuma das enzimas antioxidantes medidas.

Os níveis de expressão gênica da HSP 72 do grupo Exe apresentaram significativa redução comparado ao grupo CT ($0,53 \pm 0,18$ x controle; $P < 0,05$).

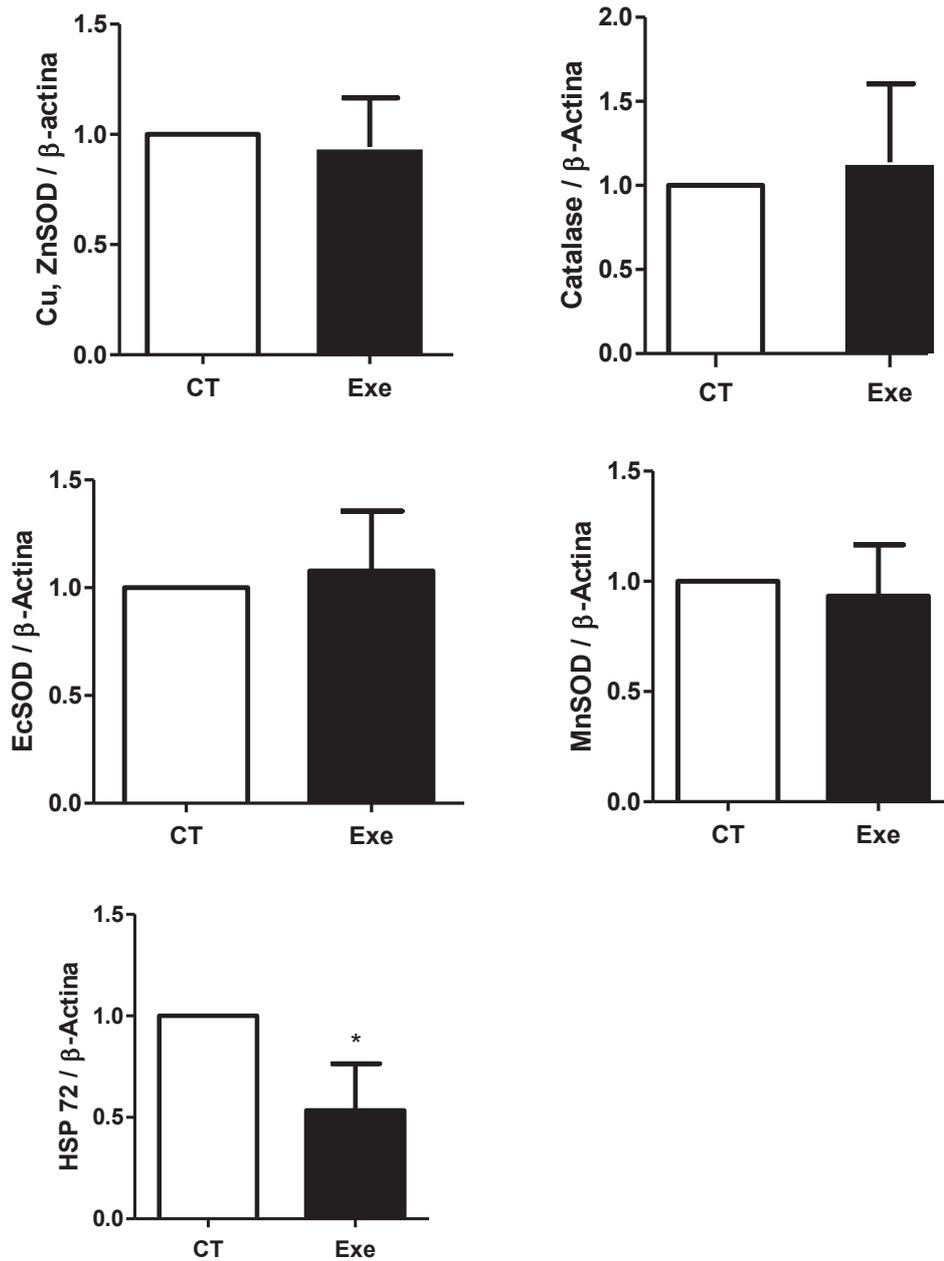


Figura 4.10: Resultados dos níveis de expressão do RNAm normalizados pela β -actina de enzimas antioxidantes (Cu,ZnSOD, Catalase, EcSOD, MnSOD) e HSP 72, encontrados no ventrículo esquerdo, nos grupos Exe (n = 3) e CT (n = 5). * $p < 0,05$ vs CT

4.6 Envolvimento de Cada Tipo de Receptor Opióide na Cardioproteção Induzida Pelo Exercício

Bloqueio Farmacológico

Para melhor visualização dos resultados, foram utilizados os valores para as áreas de infarto obtidas para os grupos CT e Exe do tópico 4.4.

Observamos que quando os receptores kappa e mu foram bloqueados, a área de infarto foi significativamente menor comparado ao grupo CT e não houve diferença em relação ao grupo Exe (figura 4.11). No entanto quando o receptor delta foi bloqueado, não houve diferença na área de infarto em relação ao grupo CT, o que sugere que a cardioproteção conferida pelo exercício foi abolida.

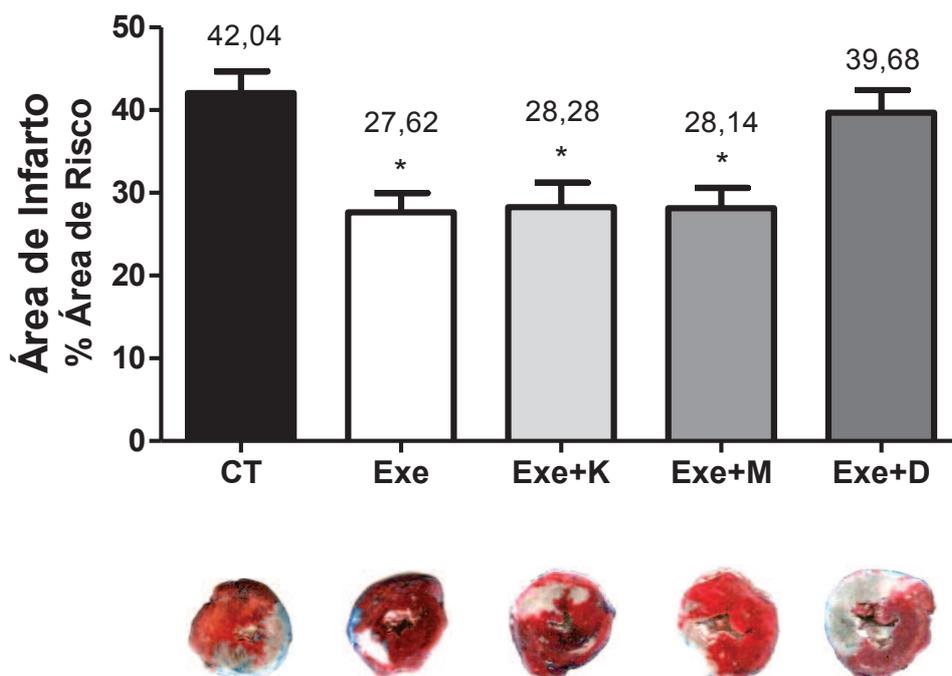


Figura 4.11: Área de infarto após lesão por isquemia e reperfusão no modelo *in vivo* nos grupos controle (CT; n = 10), exercitado (Exe; n = 10), exercitado submetido a bloqueio seletivo de receptores kappa (Exe + K; n = 5), exercitado submetido a bloqueio seletivo de receptores mu (Exe + M; n = 5) e exercitado submetido a bloqueio seletivo de receptores delta (Exe + D; n=5). * $p < 0,05$ vs CT

Expressão dos Subtipos de Receptores Opióides

Para verificação da expressão proteica dos diferentes subtipos de receptores opióides (mu, kappa e delta) foi utilizado western blotting. Devido a essa questão estar diretamente relacionada ao objetivo principal do trabalho, foram feitas duas diferentes análises dos grupos Exe e CT: com e sem a indução da lesão por IR.

A figura 4.12, referentes aos grupos com lesão por IR, mostra que o grupo Exe (n = 3) apresentou menor expressão proteica para os receptores kappa comparado ao CT (n = 5) (Exe: $0,46 \pm 0,07$ vs. CT: $0,82 \pm 0,08$ u.a.; $p < 0,05$). Já para os receptores delta, apesar da tendência, não foi encontrada diferença estatística entre os grupos estudados (Exe: $0,38 \pm 0,06$ vs. CT: $0,61 \pm 0,11$ u.a.; $p > 0,05$). Por fim, a análise para o receptor mu, não detectou nenhuma expressão proteica no VE dos animais.

Na figura 4.13 pode-se observar os resultados referentes aos grupos sem a lesão por IR, nos quais o grupo Exe (n = 5) novamente apresentou menor expressão proteica para os receptores kappa comparado ao CT (n = 4) (Exe: $0,58 \pm 0,03$ vs. CT: $0,99 \pm 0,17$ u.a.; $p < 0,05$). Além disso, a expressão dos receptores delta também estava reduzida no grupo Exe em relação ao CT (Exe: $0,95 \pm 0,10$ vs. CT: $1,50 \pm 0,12$ u.a.; $p < 0,05$).

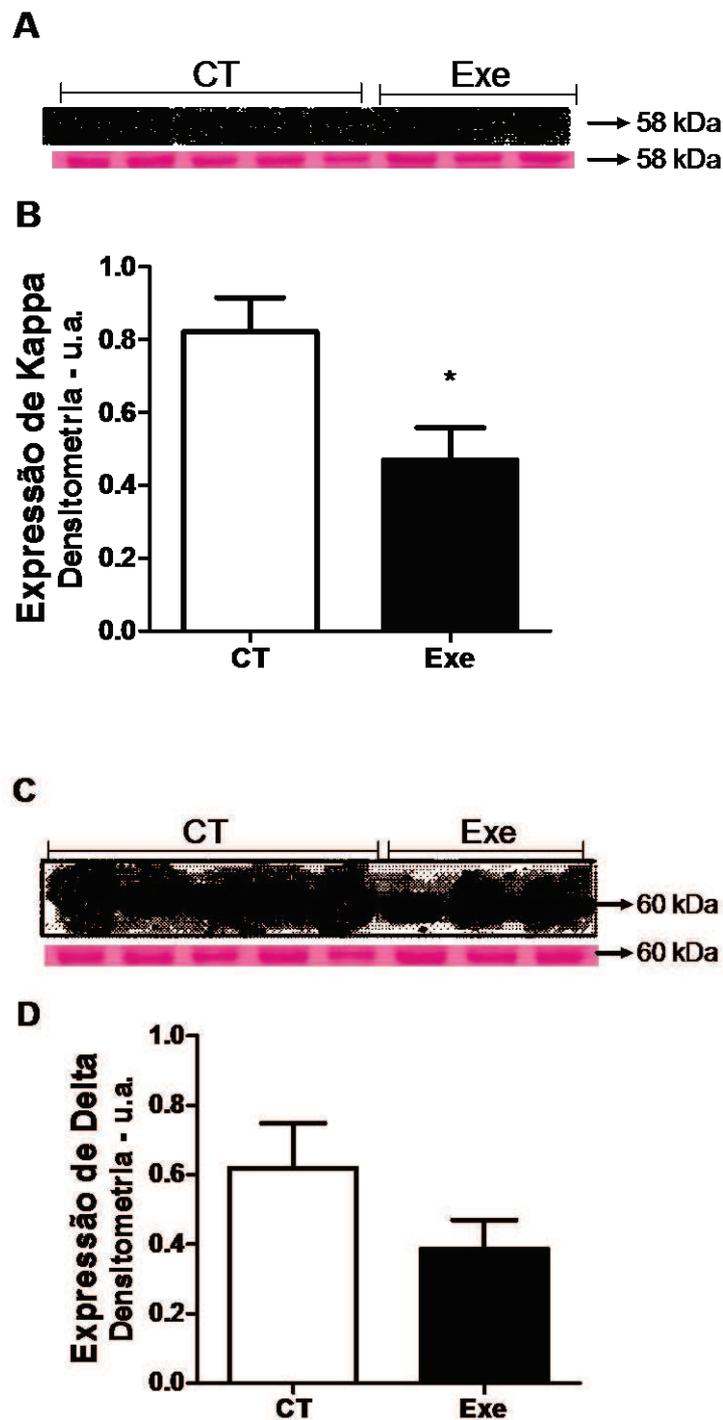


Figura 4.12: Expressão dos subtipos de receptores opióides após lesão por isquemia e reperfusão. Immunoblots dos grupos controle (CT; n = 5) e exercitados (Exe; n = 3) para receptor opióide kappa (A) e delta (C), sendo as bandas em rosa coradas com “Ponceau”. Os gráficos representam a expressão dos receptores opióides kappa (B) e delta (D) normalizados por “Ponceau”. u.a. unidades arbitrárias * p < 0,05 vs CT

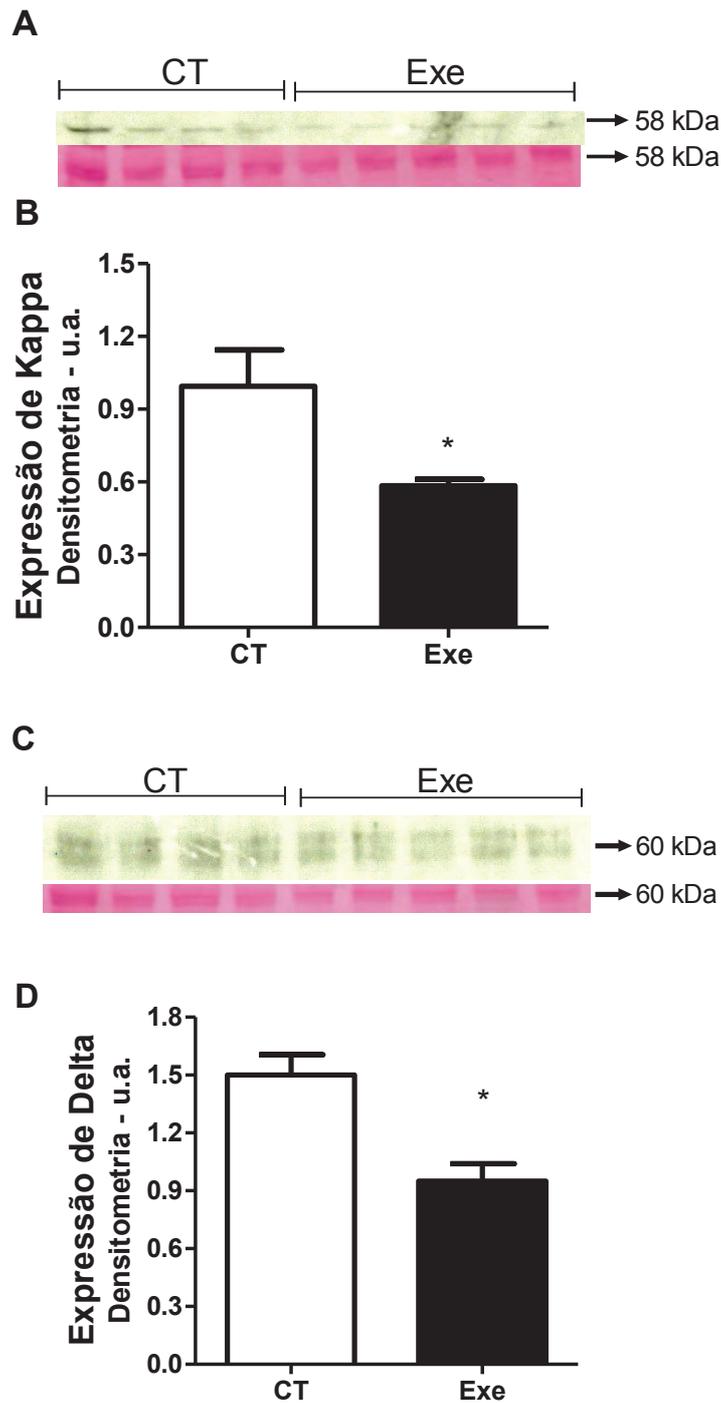


Figura 4.13: Expressão dos subtipos de receptores opióides sem lesão por IR. Immunoblots dos grupos controle (CT; n = 4) e exercitados (Exe; n = 5) para receptor opióide kappa (A) e delta (C), sendo as bandas em rosa coradas com “Ponceau”. Os gráficos representam a expressão dos receptores opióides kappa (B) e delta (D) normalizados por “Ponceau”. u.a. unidades arbitrárias * $p < 0,05$ vs CT

5 *Discussão*

O objetivo primordial da tese foi investigar em modelo *in vivo* e *ex vivo*, a relativa participação dos receptores opióides na cardioproteção contra a lesão de IR induzida pelo exercício aeróbio de intensidade moderada em ratos, bem como especificar o subtipo desses receptores envolvido nessa resposta. A maior contribuição do estudo deu-se no sentido de demonstrar, através de nosso modelo *in vivo*, que o efeito cardioprotetor induzido pelo exercício aeróbio de curta duração é mediado, ao menos em parte, pelo receptor opióide delta. Além disso, buscou-se estabelecer de que forma outros possíveis mecanismos estariam relacionados com a cardioproteção. Nesse sentido, nossos resultados indicaram que a angiogênese, elevação na defesa antioxidante e na HSP72 aparentemente, não desempenham papel obrigatório para obtenção da proteção.

Antes de discutirmos os mecanismos envolvidos na cardioproteção induzida pelo exercício, alguns resultados interessantes relacionados aos efeitos do exercício por si só devem ser comentados. Foi verificado que 4 sessões consecutivas de exercício em esteira por 60 min a 70% do $VO_{2máx}$, reduziram a área de infarto dos animais em aproximadamente 35% e 70% após IR em modelo *in vivo* e em *ex vivo* (Langendorff); respectivamente. A grande diferença obtida entre esses resultados leva a crer que o exercício realizado previamente à isquemia coronariana no animal intacto ou no coração isolado induz cardioproteção de diferentes magnitudes. Baseando-se nessa premissa, efeitos intrínsecos exclusivos do coração podem sofrer algum tipo de sobreposição por algum elemento sistêmico que contrapõe a cardioproteção. No entanto, o fato de aqui ter sido realizada isquemia global no Langendorff e regional no *in vivo*, dificulta maiores interpretações. Futuramente, investimentos no sentido de promover isquemia parcial em ambos os modelos, seriam no mínimo interessantes para estender essa discussão.

Ainda se tratando do efeito cardioprotetor aqui observado, além da redução na área de infarto, também verificamos que o exercício melhora a PDVE (a rever, pressão desenvolvida do VE), ou seja, a função ventricular após IR em Langendorff. É importante notar que esse efeito foi mais relacionado a função diastólica do que sistólica, tendo em vista os melhores resultados de pressão mínima que máxima do VE. De fato, há evidência de que o exercício atenua a pressão mínima aumentada após IR [60], considerada melhor parâmetro fisiológico que reflete a sobrecarga de cálcio [57]. Quanto ao modelo *in vivo*, infelizmente não foi possível medir a pressão

intraventricular, pois quando era realizado cateterismo do VE seguido de IR, a presença de arritmia levava o animal a óbito e inviabilizava o experimento. No entanto, apesar de melhores parâmetros existirem, em última instância, a PAS está associada ao débito cardíaco, bem como a PAD ao tônus vascular. Nesse sentido, vale ressaltar que o exercício foi capaz de manter os valores de PAS, PAM e PAD mais próximos do basal em relação aos controles, principalmente após 30 min de isquemia.

Com relação aos mecanismos mediadores da cardioproteção, em nosso modelo de cardioproteção induzida por 4 sessões de exercício, não foi possível detectar alteração na DCE (a rever, densidade capilar estrutural) do VE. O impacto do exercício na densidade capilar é um tema já bastante discutido na literatura [12, 20, 32, 79, 80, 124]. Já se sabe que o remodelamento da rede vascular é uma adaptação crônica ao exercício, que requer várias semanas de treinamento aeróbio [20, 79]. Em trabalho recente [125], no qual foi usada mesma metodologia de verificação de densidade capilar que no presente trabalho, os autores verificaram aumento no número de capilares do miocárdio e músculo esquelético após 13 semanas de treinamento físico aeróbio contínuo e intervalado. Essa questão do tempo de treinamento necessário para induzir aumento na densidade capilar foi bem explorada por White et al [79], que avaliaram a microcirculação coronária em porcos treinados por 1, 3, 8 e 16 semanas. Os autores verificaram que apesar do número de células endoteliais ter aumentado após 1 semana de exercício, o aumento na densidade capilar só foi possível a partir de 3 semanas de treinamento.

Ainda em relação à angiogênese, foi aqui demonstrado que a expressão basal do VEGF, importante fator de crescimento modulado pelo exercício capaz de induzir angiogênese [73], não sofreu alteração 24 horas após o término das sessões de exercício. De forma similar, em trabalho recentemente publicado por Breen et al [126], uma única sessão de exercício aumentou a expressão gênica de VEGF imediatamente após a atividade, mas após algumas poucas horas, os valores retornaram aos seus níveis basais. Em estudo interessante de Olenich et al [127], que avaliou a resposta temporal de fatores angiogênicos no músculo esquelético de camundongos após exercício agudo e crônico, foi demonstrado que o VEGF estava aumentado entre 2 a 4 horas após o término de uma sessão aguda de exercício. Já os níveis basais estavam elevados somente depois de 7 dias de exercício, mas retornaram aos valores basais após 14 dias de estímulo.

Apesar de não termos encontrado evidência que indicasse angiogênese, em contrapartida, foi verificado efeito cardioprotetor consistente induzido pelo exercício físico de curta duração, de forma similar a estudos prévios que preconizaram entre 3 a 5 dias de exercício [14, 72]. Portanto, esses resultados sugerem que o efeito cardioprotetor associado ao exercício deve ser mediado por mecanismos regulatórios agudos, e não através de modificações na rede capilar miocárdica.

Em relação à contribuição direta do aumento da produção miocárdica de HSPs e enzimas antioxidantes para a cardioproteção induzida pelo exercício, apesar de toda a atenção já direcionada a essas questões, ainda restam dúvidas [12, 20, 32, 79, 80, 124]. Quanto às HSPs, sabe-se que embora o exercício de curta duração seja capaz de aumentar sua expressão [69], quando esse aumento é suprimido, a cardioproteção permanece inalterada contra lesões por IR [71, 72]. Em nosso trabalho avaliamos a expressão gênica da HSP72, através de RT-PCR quantitativo. Curiosamente, a expressão de RNAm de HSP72 estava reduzida após o exercício. O motivo pelo qual isso ocorreu não é claro, todavia é tentador supor que o aumento na expressão proteica de HSP72 característico do exercício funciona como um “feedback” negativo mediando uma redução na sua expressão gênica vista 24 h após o estímulo. De qualquer forma, nosso resultado reforçou a hipótese de que a HSP72 não possui papel fundamental no pré-condicionamento pelo exercício de curta duração.

Já os estudos que se debruçaram sobre a hipótese da melhora da capacidade antioxidativa como mediadora da cardioproteção induzida pelo exercício são mais controversos [17, 67]. Enquanto alguns autores defendem seu envolvimento [82, 128, 129], outros sugerem que o aumento na capacidade antioxidante não é observado em todos os modelos de pré-condicionamento, e que, portanto não estariam necessariamente relacionadas à cardioproteção [13, 17, 72, 130]. Mais especificamente em relação às enzimas responsáveis em converter H_2O_2 em água, poucas são as evidências existentes que relatam aumento da CAT [17] e GPX [81] após o exercício, enquanto a maioria dos estudos não encontrou diferença na atividade ou nível dessas enzimas [14, 61, 66, 67, 131, 132].

Maior consenso existe quanto ao papel do exercício na atividade da SOD [20, 22, 57, 82]. Assim como em nosso trabalho, não foram encontrados estudos que associassem qualquer papel do exercício à aumento da capacidade da EcSOD e CuZnSOD. Já a isoforma encontrada na mitocôndria, a MnSOD, evidências indicaram maior atividade após exercício [66, 82, 92, 131, 133]. Apesar disso, os níveis de RNAm

e até mesmo da expressão da MnSOD parecem não refletir esse aumento em sua atividade [57]. Como já dito, em nosso modelo, a cardioproteção conferida por 4 sessões em esteira não foi acompanhada por aumento na expressão gênica da MnSOD, CAT, EcSOD e Cu,ZnSOD. Resultados similares foram obtidos por Dickson et al [14], que também não observaram alteração na expressão gênica após exercício dessas enzimas antioxidantes por nós estudadas em modelo de IR em Langendorff. Nessa linha, Lennon et al [17], ao utilizar técnica de silenciamento da MnSOD, mostraram que mesmo após prevenir o aumento na MnSOD induzido pelo exercício, a cardioproteção ainda era observada. Portanto, deve-se ressaltar que o pré-condicionamento é um processo multifatorial, e talvez o aumento na atividade da MnSOD não esteja necessariamente relacionado ao pré-condicionamento do exercício.

Embora existam estudos que suportam nossos resultados [14, 17, 91], a ausência de análises que refletem a atividade e abundância das enzimas antioxidantes não permite que a descartemos como candidatas responsáveis pelo efeito cardioprotetor do exercício. Portanto no intuito de verificar possíveis modificações pós-traducionais que alterem seus níveis [134], novas investigações seriam bem-vindas.

No que se refere ao envolvimento dos opióides enquanto mecanismo cardioprotetor, nós verificamos que a cardioproteção induzida pelo exercício era parcialmente abolida após bloqueio não seletivo dos receptores opióides (naloxona) em ambos os modelos *in vivo* e em Langendorff. Nossos achados corroboram os resultados de Dickson et al [14], nos quais a naltrexona (antagonista não-seletivo de receptores opióides) aboliu a redução da área de infarto de ratos submetidos a lesão IR (20 min / 3h) em Langendorff observada após uma única sessão de exercício físico em esteira (exercitados: 21%, controles: 42%, após naltrexona: 43% de área de infarto). Em contraste aos nossos achados, no estudo em questão [14], o pré-condicionamento do exercício não foi associado à melhora da função contrátil do VE. Essa discrepância pode ter ocorrido em função de diferenças metodológicas, mais especificamente aos protocolos de exercício utilizados. Enquanto Dickson et al [14] aplicaram somente 1 sessão de exercício em esteira (25 min a 25 m/min), nós utilizamos 4 sessões de exercício por 60 min a 70% do $VO_{2máx}$.

Após essa primeira evidência de link entre exercício, cardioproteção e opióides fornecida por Dickson et al [14] em 2008, poucos trabalhos foram realizados nessa mesma linha [15, 19]. Galvão et al [15] se propuseram a comparar o efeito cardioprotetor induzido pelo exercício crônico mediado pelos opióides com outras

estratégias cardioprotetoras em ratos após infarto. Como resultado, verificaram que 12 semanas de treinamento físico em esteira rolante (60% do $VO_{2máx}$ durante 60 min por 5 vezes na semana) eram capazes de reduzir a área de infarto em comparação aos animais controles. Cardioproteção similar foi observada em animais submetidos ao PIM, à infusão de morfina por si só e combinada ao exercício físico. No entanto, quando era acrescentada a naloxona à infusão de morfina ou ao exercício físico, esse efeito protetor era abolido. Embora tenham sido empregadas diferentes técnicas metodológicas nesse estudo das aqui apresentadas, tal como oclusão irreversível das coronárias, Galvão et al [15] reportaram 70% de redução na área de infarto dos animais após 12 semanas de exercício enquanto em nosso modelo *in vivo*, nós observamos redução de 35% após 4 sessões de exercício. Apesar das diferenças metodológicas, a discrepância entre os resultados sugere que o exercício físico realizado por tempo superior a 4 sessões pode trazer benefício adicional na redução da área de infarto.

Nesse sentido, o impacto da duração do treinamento físico na cardioproteção, tem sido bastante discutido na literatura [61, 65, 66]. Evidências atuais indicam que poucas sessões de exercício (3 a 5 por exemplo) já são capazes de promover pré-condicionamento de mesma magnitude que treinamento físico de longa duração, como 12 semanas [61, 65, 66]. No entanto, nenhum estudo que avaliou conjuntamente protocolos de exercício de curta e longa duração foi encontrado.

Ainda se tratando do envolvimento dos opióides no efeito protetor do exercício, recentemente essa hipótese foi reforçada em estudo bastante interessante desenvolvido por Michelsen et al [19]. Nesse trabalho, os autores coletaram o plasma de 13 homens antes e após a técnica do PIM e exercício físico vigoroso (realizado 1 semana após o PIM). Em seguida, foi verificado que a perfusão desse plasma humano em coração de coelhos era capaz de reduzir a área de infarto após lesão por IR em Langendorff. Foi visto também que a infusão de naloxona no Langendorff abolia o efeito cardioprotetor observado. A partir desses resultados, os autores concluíram que o pré-condicionamento induzido por exercício físico e pelo PIM, era transferido de forma remota, inclusive de um indivíduo para outra espécie. E que essa resposta era mediada por um fator humoral dependente de opióide.

Apesar desses resultados promissores, nenhum estudo com o intuito de verificar o subtipo de receptor opióide foi encontrado. No presente trabalho a determinação da especificidade do subtipo desses receptores responsável pelos resultados encontrados foi realizada através de bloqueio farmacológico com antagonistas seletivos. Nossos

resultados apontaram, portanto, pela primeira vez na literatura, para a importância do receptor opióide delta na cardioproteção induzida pelo exercício.

Esse efeito protetor do receptor delta já foi reportado previamente em estudos que avaliaram o pré-condicionamento conferido pelo PIM [112, 115, 135, 136]. Nesses modelos, o efeito protetor mediado pelo delta parece estar associado à ativação da PKC e a abertura dos canais K_{ATP} sarco / mito [23], que por sua vez reduz a produção de EROs, sobrecarga intracelular de Ca^{2+} [20], e ainda previne a abertura dos MPTP (a rever, poro de transição de permeabilidade mitocondrial). Como já dito, tipicamente, os MPTP se abrem durante a reperfusão, resultando em edema mitocondrial e extravasamento de proteínas, que em última análise, levam a morte celular [20]. No entanto, para confirmar essa sequência de eventos e desvendar a verdadeira via intracelular que culmina em cardioproteção mediada pelo receptor opióide delta, investigações adicionais são necessárias.

No presente trabalho, foi ainda realizado western blotting para avaliar a expressão dos receptores opióides de animais após 24 horas do término de 4 sessões de exercício, submetidos ou não à lesão por IR. Curiosamente, nossos resultados indicaram que o exercício, independente da lesão por IR, reduz a expressão de receptores kappa e delta. Vale lembrar que a redução observada para o delta com a lesão por IR não foi significativamente estatística, somente houve tendência. No entanto, acredita-se que a falta de significância se deu pelo baixo número amostral.

Em estudo prévio, Aitchison et al [115] demonstraram que a estimulação do kappa anterior à oclusão da artéria coronária aumentou a área de infarto de corações de ratos. Os autores concluíram que a sinalização do kappa resulta em um estado “anti – cardioprotetor” e que a estimulação antagônica dos receptores delta e kappa estabelece um equilíbrio na sinalização do sistema opióide. De acordo com essa teoria, a cardioproteção poderia ser alcançada não somente pela estimulação do receptor delta, mas também pela redução do kappa. Apesar de nossos resultados mostrarem redução na expressão de ambos os receptores após exercício, foi notável a diferença na redução obtida entre a expressão dos receptores delta e kappa, que reduziram 36% e 41%, respectivamente. Dessa forma, isso poderia influenciar no equilíbrio do sistema opióide no sentido de promover cardioproteção.

Infelizmente, a escassez de trabalhos prévios envolvendo o efeito do exercício na expressão desses receptores dificulta a discussão dos nossos resultados. Nesse sentido, somente foi encontrado o trabalho de Dickson et al [14], que ao verificarem a expressão

de RNAm de receptores delta e kappa após uma sessão vigorosa de exercício, demonstraram que não houve aumento após 8 e 24 horas do fim exercício, somente imediatamente após a sessão. Apesar disso, a cardioproteção ainda foi verificada após 24 horas do exercício. O fato de terem sido verificados os níveis de RNAm enquanto aqui foi avaliada a expressão desses receptores, dificulta a comparação dos resultados, pois sabe-se que o aumento da expressão gênica não necessariamente se traduz em aumento da expressão proteica. Modificações pós-traducionais induzidas pelo exercício podem ter ocorrido no sentido de reduzir a expressão dos receptores. De qualquer forma, assim como no presente trabalho, Dickson et al [14] também não identificaram aumento na expressão dos receptores opióides 24 horas após o exercício. Seriam muito interessantes investigações futuras acerca da resposta do exercício na expressão dos opióides após diferentes períodos, em especial imediatamente após a sessão.

Por fim, vale destacar que no presente trabalho a expressão dos receptores mu no coração também foi investigada, mas a mesma não foi detectada através de western blotting. Estudos prévios que também não detectaram expressão de mu no coração de ratos suportam a ideia da ausência desses receptores nesse tecido [109, 110, 115]. Além disso, considerando que o uso de antagonistas seletivos de mu não mostrou modulação da área de infarto, o papel desses receptores opióides como cardioprotetores foi descartado.

Algumas limitações do estudo devem ser apontadas. Talvez uma das principais resida no fato de ter sido empregada diferente forma de administração da naloxona no protocolo *ex vivo* e *in vivo*. No modelo *ex vivo*, os animais eram tratados com injeção intraperitoneal 15 min antes de cada sessão de exercício físico, enquanto no modelo *in vivo* a administração era feita após as sessões de exercício físico via intravenosa, uma única vez, 10 min antes da oclusão coronária. É importante destacar que a escolha de tais formas de administração se baseou em estudos prévios [14, 15]. De qualquer forma, em ambos os protocolos foi verificado bloqueio parcial da cardioproteção do exercício após naloxona, que pode significar que o sistema opióide não age somente como um intermediário da adaptação aguda do miocárdio ao exercício, mas também como agente final imediatamente antes do insulto ao miocárdio, ou seja, por uma via direta de cardioproteção. Outra importante limitação é representada pela ausência de parâmetros relacionados aos níveis de ligantes endógenos opióides em resposta ao exercício. O efeito mediado por um receptor não depende só de sua expressão, mas também da quantidade de agonistas circulantes. Portanto, alteração nesses níveis, seja aumento ou

redução, poderia representar modificação do efeito que a ligação agonista-receptor desencadeia. Por fim, vale destacar que diferenças fisiológicas marcantes são observadas entre humanos e roedores, o que pede cautela na extrapolação destes achados entre as espécies. Apesar de serem bem aceitos em pesquisas envolvendo IR, devido à impossibilidade da realização em humanos, os ratos possuem diferenças anatômicas no sistema cardiovascular, que levam a modificações no comportamento cardiovascular, como exemplo o fato da FC normal variar entre 300 a 500 batimentos por minuto [137, 138].

6 Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- Exercício físico aeróbio realizado por 4 dias consecutivos a 70% do $VO_{2máx}$ é capaz de conferir cardioproteção contra lesão por IR, através da manutenção da função cardíaca e redução da área de infarto, em modelos *in vivo* e *ex vivo* em ratos.
- O pré-condicionamento induzido pelo exercício não está obrigatoriamente associado a aumento na densidade capilar estrutural do ventrículo esquerdo. Assim como pode não estar vinculado necessariamente a aumento nas proteínas de choque térmico 72 e capacidade antioxidante.
- Esse efeito cardioprotetor associado ao exercício é mediado, ao menos em parte, pelo sistema dos opióides endógenos.
- Dentre os receptores opióides, o receptor delta é o principal responsável pelo efeito cardioprotetor induzido pelo exercício.

Em conjunto, os resultados sugerem que mesmo poucas sessões de exercício físico podem proporcionar cardioproteção, que está associada ao sistema de opióides endógenos, e mais especificamente aos receptores delta.

7 Trabalhos Apresentados em Congressos

- (Prêmio Travel Grant) Borges, JP; Tristão, M; Tibiriçá, E; Lessa, MA. *Exercise-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury is abolished by opioid system blockage using an in vivo rat model*. European Society of Cardiology Congress 2013, Amsterdam, 2013. In: European Heart Journal Supplements. Oxford: Journals Oxford University Press, 2013. v. 34. p. 503-503.
- Borges, JP; Tibiriçá, E; Lessa, MA. *Delta Opioid Receptor Blockade Abolishes Exercise-Induced Cardioprotection Against Ischemia-Reperfusion Injury In Vivo*. Basic Cardiovascular Science 2013 Scientific Sessions - American Heart Association, Las Vegas, 2013. In: Circulation Research, 2013. v. 113. p. A100.
- Borges, JP; Paes, LS; Tibiriçá, E; Lessa, MA. *Exercise-Induced Cardioprotection Against Ischemia-Reperfusion Injury Is Abolished by Opioid System Blockage Using an In Vitro Rat Model*. Basic Cardiovascular Science 2013 Scientific Sessions - American Heart Association, Las Vegas, 2013. In: Circulation Research, 2013. v. 113. p. A100.
- (Prêmio de 2º Lugar em Pesquisa Básica) Borges, JP; Paes, LS; Tibiriçá, E; Lessa, MA. *Cardioproteção induzida pelo exercício contra lesão por isquemia e reperfusão do miocárdio é abolida por bloqueio dos receptores opióides em ratos*. XXXIV Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo – Jornada de Educação Física, São Paulo, 2013.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Mansur Ade P, Favarato D. Mortality due to cardiovascular diseases in Brazil and in the metropolitan region of Sao Paulo: a 2011 update. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2012 Aug;99(2):755-61.
- [2] Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the american heart association. *Circulation*. 2014 Jan 21;129(3):e28-e292.
- [3] Piegas LS. III Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2004;83(4):2-86.
- [4] Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free radical biology & medicine*. 2008 Jan 15;44(2):193-201.
- [5] Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacological reviews*. 2007 Dec;59(4):418-58.
- [6] Evora PR, Pearson PJ, Seccombe JF, Schaff HV. [Ischemia-reperfusion lesion. Physiopathologic aspects and the importance of the endothelial function]. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 1996 Apr;66(4):239-45.
- [7] Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*. 2013 Jan 2;123(1):92-100.
- [8] Berlin JA, Colditz GA. A meta-analysis of physical activity in the prevention of coronary heart disease. *Am J Epidemiol*. 1990 Oct;132(4):612-28.
- [9] Sattelmair J, Pertman J, Ding EL, Kohl HW, 3rd, Haskell W, Lee IM. Dose response between physical activity and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *Circulation*. 2011 Aug 16;124(7):789-95.
- [10] Paffenbarger RS, Jr., Hyde RT, Wing AL, Hsieh CC. Physical activity, all-cause mortality, and longevity of college alumni. *N Engl J Med*. 1986 Mar 6;314(10):605-13.
- [11] Hull SS, Jr., Vanoli E, Adamson PB, Verrier RL, Foreman RD, Schwartz PJ. Exercise training confers anticipatory protection from sudden death during acute myocardial ischemia. *Circulation*. 1994 Feb;89(2):548-52.
- [12] Powers SK, Lennon SL, Quindry J, Mehta JL. Exercise and cardioprotection. *Current opinion in cardiology*. 2002 Sep;17(5):495-502.

- [13] Lennon SL, Quindry J, Hamilton KL, French J, Staib J, Mehta JL, et al. Loss of exercise-induced cardioprotection after cessation of exercise. *J Appl Physiol*. 2004 Apr;96(4):1299-305.
- [14] Dickson EW, Hogrefe CP, Ludwig PS, Ackermann LW, Stoll LL, Denning GM. Exercise enhances myocardial ischemic tolerance via an opioid receptor-dependent mechanism. *American journal of physiology*. 2008 Jan;294(1):H402-8.
- [15] Galvao TF, Matos KC, Brum PC, Negrao CE, Luz PL, Chagas AC. Cardioprotection conferred by exercise training is blunted by blockade of the opioid system. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(1):151-7.
- [16] Lee Y, Min K, Talbert EE, Kavazis AN, Smuder AJ, Willis WT, et al. Exercise protects cardiac mitochondria against ischemia-reperfusion injury. *Med Sci Sports Exerc*. 2012 Mar;44(3):397-405.
- [17] Lennon SL, Quindry JC, Hamilton KL, French JP, Hughes J, Mehta JL, et al. Elevated MnSOD is not required for exercise-induced cardioprotection against myocardial stunning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Aug;287(2):H975-80.
- [18] Quindry J, French J, Hamilton K, Lee Y, Mehta JL, Powers S. Exercise training provides cardioprotection against ischemia-reperfusion induced apoptosis in young and old animals. *Exp Gerontol*. 2005 May;40(5):416-25.
- [19] Michelsen MM, Stottrup NB, Schmidt MR, Lofgren B, Jensen RV, Tropak M, et al. Exercise-induced cardioprotection is mediated by a bloodborne, transferable factor. *Basic Res Cardiol*. 2012;107(3):260.
- [20] Golbidi S, Laher I. Molecular mechanisms in exercise-induced cardioprotection. *Cardiol Res Pract*. 2011;2011:972807.
- [21] McElroy CL, Gissen SA, Fishbein MC. Exercise-induced reduction in myocardial infarct size after coronary artery occlusion in the rat. *Circulation*. 1978 May;57(5):958-62.
- [22] Quindry JC, Hamilton KL. Exercise and cardiac preconditioning against ischemia reperfusion injury. *Curr Cardiol Rev*. 2013 Aug;9(3):220-9.
- [23] Schultz JE, Gross GJ. Opioids and cardioprotection. *Pharmacol Ther*. 2001 Feb;89(2):123-37.
- [24] Schultz JE, Rose E, Yao Z, Gross GJ. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol*. 1995 May;268(5 Pt 2):H2157-61.

- [25] Schultz JJ, Hsu AK, Gross GJ. Ischemic preconditioning is mediated by a peripheral opioid receptor mechanism in the intact rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1997 May;29(5):1355-62.
- [26] Tsang A, Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial postconditioning: reperfusion injury revisited. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Jul;289(1):H2-7.
- [27] Kato R, Foex P. Myocardial protection by anesthetic agents against ischemia-reperfusion injury: an update for anesthesiologists. *Can J Anaesth.* 2002 Oct;49(8):777-91.
- [28] Wang GY, Wu S, Pei JM, Yu XC, Wong TM. Kappa- but not delta-opioid receptors mediate effects of ischemic preconditioning on both infarct and arrhythmia in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001 Jan;280(1):H384-91.
- [29] Paffenbarger RS, Jr., Hyde RT, Hsieh CC, Wing AL. Physical activity, other life-style patterns, cardiovascular disease and longevity. *Acta Med Scand Suppl.* 1986;711:85-91.
- [30] Astrand PO. J.B. Wolffe Memorial Lecture. "Why exercise?" Medicine and science in sports and exercise. 1992 Feb;24(2):153-62.
- [31] Nocon M, Hiemann T, Muller-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 Jun;15(3):239-46.
- [32] Golbidi S, Laher I. Exercise and the cardiovascular system. *Cardiol Res Pract.* 2012;2012:210852.
- [33] Ascensao A, Ferreira R, Magalhaes J. Exercise-induced cardioprotection--biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. *International journal of cardiology.* 2007 Apr 12;117(1):16-30.
- [34] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 Jan 14;340(2):115-26.
- [35] Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J.* 1999 Nov;138(5 Pt 2):S419-20.
- [36] Segal S, ed. *Special circulations.* Philadelphia: Saunders 2003.
- [37] Laughlin MH, Bowles DK, Duncker DJ. The coronary circulation in exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012 Jan 1;302(1):H10-23.
- [38] Lynch PJ. *ADAM* 2006.

- [39] Newsholme EA, Leech AR, eds. *Biochemistry for the medical sciences.*: John Wiley & Sons. 1983.
- [40] Powers SK, Murlasits Z, Wu M, Kavazis AN. Ischemia-reperfusion-induced cardiac injury: a brief review. *Med Sci Sports Exerc.* 2007 Sep;39(9):1529-36.
- [41] Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation.* 1982 Dec;66(6):1146-9.
- [42] Kim GT, Chun YS, Park JW, Kim MS. Role of apoptosis-inducing factor in myocardial cell death by ischemia-reperfusion. *Biochemical and biophysical research communications.* 2003 Sep 26;309(3):619-24.
- [43] Powers SK, Smuder AJ, Kavazis AN, Quindry JC. Mechanisms of exercise-induced cardioprotection. *Physiology (Bethesda).* 2014 Jan;29(1):27-38.
- [44] Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *Journal of biomedicine & biotechnology.*2012:936486.
- [45] Newsholme P, Rebelato E, Abdulkader F, Krause M, Carpinelli A, Curi R. Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and beta-cell function: a critical role for amino acids. *The Journal of endocrinology.* Jul;214(1):11-20.
- [46] Bobba A, Amadoro G, Valenti D, Corsetti V, Lassandro R, Atlante A. Mitochondrial respiratory chain Complexes I and IV are impaired by beta-amyloid via direct interaction and through Complex I-dependent ROS production, respectively. *Mitochondrion.* Jul;13(4):298-311.
- [47] Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Sep;59(9):1428-59.
- [48] Decoursey TE, Ligeti E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life Sci.* 2005 Oct;62(19-20):2173-93.
- [49] Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2000 Aug 1;97(16):8841-8.
- [50] Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research.* Oct 29;107(9):1058-70.
- [51] Hutcheson R, Rocic P. The metabolic syndrome, oxidative stress, environment, and cardiovascular disease: the great exploration. *Experimental diabetes research.*2012:271028.

- [52] Pennathur S, Heinecke JW. Oxidative stress and endothelial dysfunction in vascular disease. *Current diabetes reports*. 2007 Aug;7(4):257-64.
- [53] Werns SW, Fantone JC, Ventura A, Lucchesi BR. Myocardial glutathione depletion impairs recovery of isolated blood-perfused hearts after global ischaemia. *J Mol Cell Cardiol*. 1992 Nov;24(11):1215-20.
- [54] Patel HH, Hsu A, Gross GJ. Attenuation of heat shock-induced cardioprotection by treatment with the opiate receptor antagonist naloxone. *American journal of physiology*. 2002 Jun;282(6):H2011-7.
- [55] O'Neill WW, Martin JL, Dixon SR, Bartorelli AL, Trabattoni D, Oemrawsingh PV, et al. Acute Myocardial Infarction with Hyperoxemic Therapy (AMIHOT): a prospective, randomized trial of intracoronary hyperoxemic reperfusion after percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Jul 31;50(5):397-405.
- [56] Duncker DJ, Klassen CL, Ishibashi Y, Herrlinger SH, Pavek TJ, Bache RJ. Effect of temperature on myocardial infarction in swine. *Am J Physiol*. 1996 Apr;270(4 Pt 2):H1189-99.
- [57] Frasier CR, Moore RL, Brown DA. Exercise-induced cardiac preconditioning: how exercise protects your achy-breaky heart. *J Appl Physiol (1985)*. 2011 Sep;111(3):905-15.
- [58] Zdrengea D, Ilea M, Predescu D, Potang E. Ischemic preconditioning during successive exercise testing. *Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne*. 1998 Jul-Dec;36(3-4):161-5.
- [59] Lambiase PD, Edwards RJ, Cusack MR, Bucknall CA, Redwood SR, Marber MS. Exercise-induced ischemia initiates the second window of protection in humans independent of collateral recruitment. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Apr 2;41(7):1174-82.
- [60] Brown DA, Jew KN, Sparagna GC, Musch TI, Moore RL. Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rat heart. *J Appl Physiol (1985)*. 2003 Dec;95(6):2510-8.
- [61] Powers SK, Demirel HA, Vincent HK, Coombes JS, Naito H, Hamilton KL, et al. Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol*. 1998 Nov;275(5 Pt 2):R1468-77.
- [62] Starnes JW, Taylor RP, Ciccolo JT. Habitual low-intensity exercise does not protect against myocardial dysfunction after ischemia in rats. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2005 Apr;12(2):169-74.

- [63] Bowles DK, Farrar RP, Starnes JW. Exercise training improves cardiac function after ischemia in the isolated, working rat heart. *Am J Physiol*. 1992 Sep;263(3 Pt 2):H804-9.
- [64] Lennon SL, Quindry JC, French JP, Kim S, Mehta JL, Powers SK. Exercise and myocardial tolerance to ischaemia-reperfusion. *Acta physiologica Scandinavica*. 2004 Oct;182(2):161-9.
- [65] Hamilton KL, Quindry JC, French JP, Staib J, Hughes J, Mehta JL, et al. MnSOD antisense treatment and exercise-induced protection against arrhythmias. *Free Radic Biol Med*. 2004 Nov 1;37(9):1360-8.
- [66] Demirel HA, Powers SK, Zergeroglu MA, Shanely RA, Hamilton K, Coombes J, et al. Short-term exercise improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *J Appl Physiol (1985)*. 2001 Nov;91(5):2205-12.
- [67] Hamilton KL, Staib JL, Phillips T, Hess A, Lennon SL, Powers SK. Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med*. 2003 Apr 1;34(7):800-9.
- [68] Powers SK, Locke, Demirel HA. Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from I-R injury. *Med Sci Sports Exerc*. 2001 Mar;33(3):386-92.
- [69] Locke M, Noble EG, Tanguay RM, Feild MR, Ianuzzo SE, Ianuzzo CD. Activation of heat-shock transcription factor in rat heart after heat shock and exercise. *Am J Physiol*. 1995 Jun;268(6 Pt 1):C1387-94.
- [70] Locke M, Tanguay RM, Klabunde RE, Ianuzzo CD. Enhanced postischemic myocardial recovery following exercise induction of HSP 72. *Am J Physiol*. 1995 Jul;269(1 Pt 2):H320-5.
- [71] Taylor RP, Harris MB, Starnes JW. Acute exercise can improve cardioprotection without increasing heat shock protein content. *Am J Physiol*. 1999 Mar;276(3 Pt 2):H1098-102.
- [72] Hamilton KL, Powers SK, Sugiura T, Kim S, Lennon S, Tumer N, et al. Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Sep;281(3):H1346-52.
- [73] Brown MD. Exercise and coronary vascular remodelling in the healthy heart. *Exp Physiol*. 2003 Sep;88(5):645-58.
- [74] Vicaut E. Microcirculation and arterial hypertension. *Drugs*. 1999;58 Spec No 1:1-10.

- [75] Guyton AC, Hall JE, eds. Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2002.
- [76] Skalak TC, Price RJ, Zeller PJ. Where do new arterioles come from? Mechanical forces and microvessel adaptation. *Microcirculation*. 1998;5(2-3):91-4.
- [77] Kozakova M, Galetta F, Gregorini L, Bigalli G, Franzoni F, Giusti C, et al. Coronary vasodilator capacity and epicardial vessel remodeling in physiological and hypertensive hypertrophy. *Hypertension*. 2000 Sep;36(3):343-9.
- [78] Krams DM, Aspen AJ, Abramowitz BM, Kreimendahl T, Hood WB, Jr. Reduction of coronary atherosclerosis by moderate conditioning exercise in monkeys on an atherogenic diet. *N Engl J Med*. 1981 Dec 17;305(25):1483-9.
- [79] White FC, Bloor CM, McKirnan MD, Carroll SM. Exercise training in swine promotes growth of arteriolar bed and capillary angiogenesis in heart. *J Appl Physiol* (1985). 1998 Sep;85(3):1160-8.
- [80] Laughlin MH, McAllister RM. Exercise training-induced coronary vascular adaptation. *J Appl Physiol* (1985). 1992 Dec;73(6):2209-25.
- [81] Husain K, Somani SM. Interaction of exercise and adenosine receptor agonist and antagonist on rat heart antioxidant defense system. *Mol Cell Biochem*. 2005 Feb;270(1-2):209-14.
- [82] Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Asahi M, Kuzuya T, Hori M. Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *J Exp Med*. 1999 Jun 7;189(11):1699-706.
- [83] Chicco AJ, Johnson MS, Armstrong CJ, Lynch JM, Gardner RT, Fasen GS, et al. Sex-specific and exercise-acquired cardioprotection is abolished by sarcolemmal KATP channel blockade in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 May;292(5):H2432-7.
- [84] Cole WC, McPherson CD, Sontag D. ATP-regulated K⁺ channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circ Res*. 1991 Sep;69(3):571-81.
- [85] Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature*. 1983 Sep 8-14;305(5930):147-8.
- [86] Nichols CG, Ripoll C, Lederer WJ. ATP-sensitive potassium channel modulation of the guinea pig ventricular action potential and contraction. *Circ Res*. 1991 Jan;68(1):280-7.

- [87] Suzuki M, Sasaki N, Miki T, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, et al. Role of sarcolemmal K(ATP) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest*. 2002 Feb;109(4):509-16.
- [88] Brown DA, Chicco AJ, Jew KN, Johnson MS, Lynch JM, Watson PA, et al. Cardioprotection afforded by chronic exercise is mediated by the sarcolemmal, and not the mitochondrial, isoform of the KATP channel in the rat. *J Physiol*. 2005 Dec 15;569(Pt 3):913-24.
- [89] Marques-Neto SR, Ferraz EB, Rodrigues DC, Njaine B, Rondinelli E, Campos de Carvalho AC, et al. AT and Aldosterone Receptors Blockade Prevents the Chronic Effect of Nandrolone on the Exercise-Induced Cardioprotection in Perfused rat Heart Subjected to Ischemia and Reperfusion. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*. Nov 21.
- [90] Zingman LV, Hodgson DM, Bast PH, Kane GC, Perez-Terzic C, Gumina RJ, et al. Kir6.2 is required for adaptation to stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Oct 1;99(20):13278-83.
- [91] Brown DA, Lynch JM, Armstrong CJ, Caruso NM, Ehlers LB, Johnson MS, et al. Susceptibility of the heart to ischaemia-reperfusion injury and exercise-induced cardioprotection are sex-dependent in the rat. *J Physiol*. 2005 Apr 15;564(Pt 2):619-30.
- [92] Quindry JC, Schreiber L, Hosick P, Wrieden J, Irwin JM, Hoyt E. Mitochondrial KATP channel inhibition blunts arrhythmia protection in ischemic exercised hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Jul;299(1):H175-83.
- [93] Akil H, Watson SJ, Young E, Lewis ME, Khachaturian H, Walker JM. Endogenous opioids: biology and function. *Annu Rev Neurosci*. 1984;7:223-55.
- [94] Oldroyd KG, Harvey K, Gray CE, Beastall GH, Cobbe SM. Beta endorphin release in patients after spontaneous and provoked acute myocardial ischaemia. *Br Heart J*. 1992 Mar;67(3):230-5.
- [95] Falcone C, Guasti L, Ochan M, Codega S, Tortorici M, Angoli L, et al. Beta-endorphins during coronary angioplasty in patients with silent or symptomatic myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol*. 1993 Nov 15;22(6):1614-20.
- [96] Oeltgen PR, Nilekani SP, Nuchols PA, Spurrier WA, Su TP. Further studies on opioids and hibernation: delta opioid receptor ligand selectively induced hibernation in summer-active ground squirrels. *Life Sci*. 1988;43(19):1565-74.
- [97] Oeltgen PR, Horton ND, Bolling SF, Su TP. Extended lung preservation with the use of hibernation trigger factors. *Ann Thorac Surg*. 1996 May;61(5):1488-93.

- [98] Chien GL, Van Winkle DM. Naloxone blockade of myocardial ischemic preconditioning is stereoselective. *J Mol Cell Cardiol.* 1996 Sep;28(9):1895-900.
- [99] Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circ Res.* 1996 Jun;78(6):1100-4.
- [100] Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res.* 1990 Apr;66(4):1133-42.
- [101] Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation.* 1991 Jul;84(1):350-6.
- [102] Liu Y, Downey JM. Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am J Physiol.* 1992 Oct;263(4 Pt 2):H1107-12.
- [103] Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res.* 1992 Feb;70(2):223-33.
- [104] Tomai F, Crea F, Gaspardone A, Versaci F, De Paulis R, Penta de Peppo A, et al. Ischemic preconditioning during coronary angioplasty is prevented by glibenclamide, a selective ATP-sensitive K⁺ channel blocker. *Circulation.* 1994 Aug;90(2):700-5.
- [105] Ottani F, Galvani M, Ferrini D, Sorbello F, Limonetti P, Pantoli D, et al. Prodromal angina limits infarct size. A role for ischemic preconditioning. *Circulation.* 1995 Jan 15;91(2):291-7.
- [106] Martin WR. Pharmacology of opioids. *Pharmacol Rev.* 1983 Dec;35(4):283-323.
- [107] Paterson SJ, Robson LE, Kosterlitz HW. Classification of opioid receptors. *Br Med Bull.* 1983 Jan;39(1):31-6.
- [108] Dhawan BN, Cesselin F, Raghurir R, Reisine T, Bradley PB, Portoghese PS, et al. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev.* 1996 Dec;48(4):567-92.
- [109] Pugsley MK. The diverse molecular mechanisms responsible for the actions of opioids on the cardiovascular system. *Pharmacol Ther.* 2002 Jan;93(1):51-75.
- [110] Wittert G, Hope P, Pyle D. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochemical and biophysical research communications.* 1996 Jan 26;218(3):877-81.

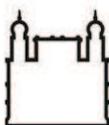
- [111] Ventura C, Spurgeon H, Lakatta EG, Guarnieri C, Capogrossi MC. Kappa and delta opioid receptor stimulation affects cardiac myocyte function and Ca²⁺ release from an intracellular pool in myocytes and neurons. *Circ Res*. 1992 Jan;70(1):66-81.
- [112] Schultz JE, Hsu AK, Gross GJ. Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by delta1- but not mu- or kappa-opioid receptors. *Circulation*. 1998 Apr 7;97(13):1282-9.
- [113] Liang BT, Gross GJ. Direct preconditioning of cardiac myocytes via opioid receptors and KATP channels. *Circ Res*. 1999 Jun 25;84(12):1396-400.
- [114] Schultz JJ, Hsu AK, Gross GJ. Ischemic preconditioning and morphine-induced cardioprotection involve the delta (delta)-opioid receptor in the intact rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1997 Aug;29(8):2187-95.
- [115] Aitchison KA, Baxter GF, Awan MM, Smith RM, Yellon DM, Opie LH. Opposing effects on infarction of delta and kappa opioid receptor activation in the isolated rat heart: implications for ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol*. 2000 Feb;95(1):1-10; discussion 1.
- [116] Thoren P, Floras JS, Hoffmann P, Seals DR. Endorphins and exercise: physiological mechanisms and clinical implications. *Med Sci Sports Exerc*. 1990 Aug;22(4):417-28.
- [117] Howlett TA, Tomlin S, Ngahfoong L, Rees LH, Bullen BA, Skrinar GS, et al. Release of beta endorphin and met-enkephalin during exercise in normal women: response to training. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984 Jun 30;288(6435):1950-2.
- [118] Surbey GD, Andrew GM, Cervenko FW, Hamilton PP. Effects of naloxone on exercise performance. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1984 Sep;57(3):674-9.
- [119] Sgherza AL, Axen K, Fain R, Hoffman RS, Dunbar CC, Haas F. Effect of naloxone on perceived exertion and exercise capacity during maximal cycle ergometry. *J Appl Physiol (1985)*. 2002 Dec;93(6):2023-8.
- [120] Mattfeldt T, Mall G, Gharehbaghi H, Moller P. Estimation of surface area and length with the orientator. *Journal of microscopy*. 1990 Sep;159(Pt 3):301-17.
- [121] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8.
- [122] Dostanic I, Schultz Jel J, Lorenz JN, Lingrel JB. The alpha 1 isoform of Na,K-ATPase regulates cardiac contractility and functionally interacts and co-localizes with the Na/Ca exchanger in heart. *J Biol Chem*. 2004 Dec 24;279(52):54053-61.

- [123] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.
- [124] Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 May;1067:425-35.
- [125] Pereira F, de Moraes R, Tibirica E, Nobrega AC. Interval and continuous exercise training produce similar increases in skeletal muscle and left ventricle microvascular density in rats. *BioMed research international.*2013:752817.
- [126] Breen EC, Johnson EC, Wagner H, Tseng HM, Sung LA, Wagner PD. Angiogenic growth factor mRNA responses in muscle to a single bout of exercise. *J Appl Physiol (1985).* 1996 Jul;81(1):355-61.
- [127] Olenich SA, Gutierrez-Reed N, Audet GN, Olfert IM. Temporal response of positive and negative regulators in response to acute and chronic exercise training in mice. *J Physiol.* 2013 Oct 15;591(Pt 20):5157-69.
- [128] Dana A, Jonassen AK, Yamashita N, Yellon DM. Adenosine A(1) receptor activation induces delayed preconditioning in rats mediated by manganese superoxide dismutase. *Circulation.* 2000 Jun 20;101(24):2841-8.
- [129] Loktionova SA, Ilyinskaya OP, Kabakov AE. Early and delayed tolerance to simulated ischemia in heat-preconditioned endothelial cells: a role for HSP27. *Am J Physiol.* 1998 Dec;275(6 Pt 2):H2147-58.
- [130] Qi JS, Kam KW, Chen M, Wu S, Wong TM. Failure to confer cardioprotection and to increase the expression of heat-shock protein 70 by preconditioning with a kappa-opioid receptor agonist during ischaemia and reperfusion in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia.* 2004 Feb;47(2):214-20.
- [131] French JP, Hamilton KL, Quindry JC, Lee Y, Upchurch PA, Powers SK. Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain. *FASEB J.* 2008 Aug;22(8):2862-71.
- [132] Frasier CR, Sloan RC, Bostian PA, Gonzon MD, Kurowicki J, Lopresto SJ, et al. Short-term exercise preserves myocardial glutathione and decreases arrhythmias after thiol oxidation and ischemia in isolated rat hearts. *J Appl Physiol (1985).* 2011 Dec;111(6):1751-9.
- [133] Husain K. Interaction of physical training and chronic nitroglycerin treatment on blood pressure, nitric oxide, and oxidants/antioxidants in the rat heart. *Pharmacol Res.* 2003 Sep;48(3):253-61.

- [134] Yamakura F, Kawasaki H. Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Feb;1804(2):318-25.
- [135] Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, Khan A, Zhong A, Moses M, et al. Noninvasive remote ischemic preconditioning for global protection of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Oct;285(4):H1435-43.
- [136] Tomai F, Crea F, Gaspardone A, Versaci F, Ghini AS, Ferri C, et al. Effects of naloxone on myocardial ischemic preconditioning in humans. *J Am Coll Cardiol*. 1999 Jun;33(7):1863-9.
- [137] Murias JM, Dey A, Campos OA, Estaki M, Hall KE, Melling CW, et al. High-intensity endurance training results in faster vessel-specific rate of vasorelaxation in type 1 diabetic rats. *PLoS One*. 2013;8(3):e59678.
- [138] Carmeli E, Haimovitch TG. The expression of MMP-2 following immobilization and high-intensity running in plantaris muscle fiber in rats. *ScientificWorldJournal*. 2006;6:542-50.

ANEXO 1

CARTA DE APROVAÇÃO DO CEUA



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-4/11

Certificamos que o protocolo (P-53/10-3), intitulado "Participação dos receptores opióides na cardioproteção induzida pelo exercício aeróbico crônico em ratos: estudo in vivo e ex vivo", sob a responsabilidade de JULIANA PEREIRA BORGES, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 07/02/2015 e inclui o uso total de :

Rattus norvegicus

- 280 Machos de Wistar, Idade: 21 Dia(s), Peso: 150,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 7 de fevereiro de 2011

**Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA**

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br