Tatiana de Fátima Gonçalves Galvão

**Ação de opióides, isquemia intermitente e treinamento físico na
redução da área de infarto do miocárdio experimental em ratos**

**Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção de grau de
Doutor em Cardiologia.**

Área de concentração: Cardiologia

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos
Palandri Chagas**

SÃO PAULO

2007

Tatiana de Fátima Gonçalves Galvão

**Ação de opióides, isquemia intermitente e treinamento físico na
redução da área de infarto do miocárdio experimental em ratos**

**Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção de grau de
Doutor em Cardiologia.**

**Área de concentração: Cardiologia
Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos
Palandri Chagas**

SÃO PAULO

2007

Dedicatória

Dedico esta tese à minha amada mãe Amélia e à minha insubstituível irmã Talita, que com seu amor incondicional e seus exemplos de coragem, persistência e simplicidade me ensinaram que não existe tesouro maior do que a convivência com quem amamos.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Palandri Chagas** pela amizade, incentivo e dedicação dispensados na minha formação acadêmica e científica durante todos estes anos.

Ao **Prof. Dr. Protásio Lemos da Luz**, pelo apoio e orientação que fundamentaram minha graduação e pós-graduação.

Aos **Profs. Drs. Carlos Eduardo Negrão e Patrícia Chakur Brum**, pelo apoio e orientação no desenvolvimento da minha formação técnica e, principalmente, pelos recursos fornecidos para a execução do experimento.

À técnica **Katt Mattos**, pela amizade, paciência e dedicação, que foram fundamentais na execução do experimento.

Às técnicas **Leonora Loppnow e Marcele de Almeida Coelho**, pela amizade e apoio sempre presentes.

Ao **Prof. Dr. Paulo Gutierrez, à Natale Rolim, Cláudia Becker e Giovanna Gonçalves**, que compartilharam comigo a realização de técnicas fundamentais para a execução do estudo.

À minha madrinha **Fátima**, que sempre me incentivou, aconselhou e apoiou.

Aos meus avós, **Elias, Joaquim, Maria e Isilda**, pelo seu exemplo de vida.

Às amigas **Anna Carolina e Vanessa**, que são as irmãs que a vida me deu.

À minha irmã **Tamaris**, pelo apoio, carinho, amor e compreensão sempre presentes.

Ao **Luciano**, meu estimado esposo, pelo incentivo, apoio, compreensão, amor e carinho sempre presentes, não só durante a execução deste estudo, mas em todos os nossos projetos de vida.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

Lista de Quadros

Lista de Figuras

Lista de Fotos

Resumo

Summary

	Página
Introdução	01
Epidemiologia da doença arterial coronariana	01
Mecanismos de preservação do miocárdio isquêmico	01
Pré-condicionamento isquêmico miocárdico	02
Ação de agentes opióides no pré-condicionamento isquêmico miocárdico	05
Manifestações clínicas de pré-condicionamento isquêmico miocárdico	08
Mecanismos celulares de pré-condicionamento isquêmico miocárdico	10
Segunda janela de pré-condicionamento	11
Relação entre inflamação, apoptose e pré-condicionamento isquêmico	12
Aplicação do pré-condicionamento isquêmico miocárdico na prática clínica	15
Papel do treinamento físico na proteção miocárdica	17
Correlação entre condicionamento físico e pré-condicionamento isquêmico	21
Relevância do experimento.....	23
Objetivos	25
Materiais e Métodos	26
Aprovação pela Comissão de Ética	26

Animais	26
Grupos de tratamento	26
Protocolo de treinamento físico	27
Avaliação do treinamento físico.....	29
Drogas.....	30
Procedimento cirúrgico.....	30
Avaliação Morfométrica.....	33
Determinação da área de infarto.....	34
Determinação da espessura do septo inter-ventricular.....	35
Determinação da densidade capilar.....	36
Aferição do peso dos animais.....	36
Análise estatística.....	37
Resultados	38
Mortalidade	38
Peso corporal e razão peso cardíaco/ peso corporal	38
Distância máxima percorrida e consumo de oxigênio	41
PDF do ventrículo esquerdo antes e 5 minutos após realização do infarto	46
Área total de risco (área do ventrículo esquerdo), relação área infartada/área de risco e espessura do septo inter-ventricular.....	48
Densidade Capilar	54
Discussão	59
Limitações do Experimento	69
Conclusão	70
Bibliografia	71
ANEXOS	89

ABREVIATURAS

K_{ATP}- Canal de potássio dependente de ATP

ATP- Tri-fosfato de adenosina

PTP- Poros de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial

PMN- Polimorfonucleares

IAMST- Infarto agudo do miocárdio com supra-desnívelamento do segmento ST

METs- Equivalentes metabólicos

VO₂- Consumo de oxigênio

VO₂ pico- Consumo máximo de oxigênio

PDF- Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo

IAM- Infarto agudo do miocárdio

VE- Ventrículo esquerdo

PAS- Ácido periódico de Schiff

Septo IV- Septo inter-ventricular

VEGF- Fator de crescimento derivado do endotélio

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Taxa de mortalidade pós-operatória segundo os grupos	38
TABELA 2: Peso dos animais no início do experimento, em gramas	39
TABELA 3: Peso dos animais no final do experimento (no dia do sacrifício), em gramas.....	39
TABELA 4: Probabilidade de significância (p) do peso dos animais no final do experimento - Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos	40
TABELA 5: Peso cardíaco, nos diferentes grupos	40
TABELA 6: Relação peso cardíaco/peso corporal (mg/g)	41
TABELA 7: Distância máxima percorrida (em metros), após 12 semanas	42
TABELA 8: Probabilidade de significância (p) para a distância máxima percorrida (em metros), após 12 semanas, Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos	42
TABELA 9: Valores de VO ₂ de repouso entre os grupos, em mililitros/minuto/quilo	44
TABELA 10: Probabilidade de significância (p) para o VO ₂ de repouso - Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos.....	44
TABELA 11- Delta VO ₂ (VO ₂ de pico menos VO ₂ de repouso) entre os grupos, em mililitros/minuto/quilo	45
TABELA 12: Probabilidade de significância (p) para o Delta VO ₂ (VO ₂ de pico menos VO ₂ de repouso) - Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos	45
TABELA 13: Valores de VO ₂ de pico entre os grupos, em mililitros/minuto/quilo.....	46
TABELA 14: Probabilidade de significância para a PDF (antes e 5 minutos após a realização do infarto), em mmHg - Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos	48

TABELA 15: Área total de risco (área de corte transversal do ventrículo esquerdo), em micrômetros	49
TABELA 16: Probabilidade de significância (p) para a área total de risco (área de corte transversal do ventrículo esquerdo), em micrômetros - Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos ..	50
TABELA 17: Probabilidade de significância (p) da área de infarto (área infartada/área de risco) - Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos	52
TABELA 18- Espessura do septo inter-ventricular (mm)	52
TABELA 19- Probabilidade de significância (p) da espessura do septo - Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos ...	53
TABELA 20: Densidade de capilares entre os grupos (em número de capilares por mm²)	54

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Média e desvio padrão da distância percorrida pelos animais dos grupos treinados, ao longo das 12 semanas de treinamento, em metros. (Análise de Variância para medidas repetidas)

..... 42

GRÁFICO 2: Valores de PDF (antes e 5 minutos após a realização do infarto), entre os grupos, em mmHg

..... 47

GRÁFICO 3: Área de infarto (área infartada/área de risco) nos diferentes grupos 51

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Fluxograma do Experimento	29
--	-----------

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Registro da pressão ventricular esquerda: onda de pressão pulsátil e intra-ventricular. A porção anterior da figura evidencia ponto de medida da PDF (seta) numa onda ventricular ampliada	32
FIGURA 2: Pode-se observar a marcação em vermelho da área normoperfundida, e em azul a marcação de zona positiva para colágeno (coloração por Masson azul). No segundo quadro está a quantificação da área total e no terceiro, da área de infarto	35

LISTA DE FOTOS

FOTO1 - Equipamento para aferição do consumo de oxigênio (VO₂) dos animais	30
FOTO 2: Secção transversal de coração de rato do grupo controle (sedentário) fixado com tricrômio de Masson	55
FOTO 3: Secção transversal de coração de rato do grupo de treinamento físico fixado com tricrômio de Masson	55
FOTO 4: Secção transversal de coração de rato do grupo que recebeu infusão de morfina fixado com tricrômio de Masson	56
FOTO 5: Secção transversal de coração de rato do grupo que recebeu treinamento físico e infusão de morfina fixado com tricrômio de Masson	56
FOTO 6: Secção transversal de coração de rato do grupo submetido à isquemia/reperfusão intermitente fixado com tricrômio de Masson	57
FOTO 7: Secção transversal de coração de rato do grupo que recebeu infusão de morfina + naloxone fixado com tricrômio de Masson	57
FOTO 8: Secção transversal de coração de rato do grupo submetido a treinamento físico e administração de naloxone fixado com tricrômio de Masson	58
FOTO 9: Secção transversal de coração de rato que evoluiu com óbito peri-operatório	58

RESUMO

Galvão TFG. Ação de opióides, isquemia intermitente e treinamento físico na redução da área de infarto do miocárdio experimental em ratos[tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

INTRODUÇÃO: Baseados em estudo que evidenciou menor área de infarto do miocárdio (IM) em ratos submetidos a treinamento físico (TF), na ausência de reperfusão; e na liberação de endorfinas que ocorre durante o TF, nossos objetivos são: demonstrar se não só TF, mas também opióides e isquemia/reperfusão (IR) intermitente são capazes de reduzir área de IM, na ausência de reperfusão; se TF e opióides exibem efeito sinérgico e se o mecanismo de redução da área de IM pelo TF envolve receptores opióides.

MATERIAIS E MÉTODOS: Ratos Wistar machos (n=76) foram divididos em 7 grupos: 1- controle; 2- TF (esteira elétrica, 1 hora/dia, 5 vezes/semana, por 12 semanas), antes do IM; 3- morfina antes do IM; 4- morfina+TF; 5- grupo com 3 ciclos de IR antes do IM; 6- naloxone antes da morfina; 7- naloxone antes de cada dia de TF. Todos os ratos foram submetidos à mensuração da pressão diastólica final (PDF) e a IM através da oclusão da artéria descendente anterior. A eficácia do TF foi avaliada através do consumo de oxigênio (VO₂) e da distância máxima percorrida. Os ratos foram sacrificados no 8º pós-IM e a área de IM mensurada por planimetria.

RESULTADOS: Não houve diferença no peso inicial (p=0,94), mortalidade (p=0,99), e relação peso cardíaco/peso corporal (p=0,29) entre os grupos. Entretanto, houve aumento do deltaVO₂ (VO₂ pico - VO₂repouso) (p=0,0001) e da distância máxima percorrida (p=0,0001), nos grupos treinados. A PDF aumentou no pós-IM, em todos os grupos (p=0,0001). Os grupos tratados tiveram menor área de IM (p=0,0001), com exceção dos grupos morfina + naloxone e TF+ naloxone sendo que não houve maior redução no grupo TF+morfina. Os grupos TF e TF+morfina apresentaram maior espessura do septo inter-ventricular, em relação ao grupo controle (p=0,0008). Já o grupo TF + naloxone não apresentou maior espessura do septo IV, em relação aos outros grupos. Também não houve diferença na densidade capilar (p=0,88).

CONCLUSÃO: Não só TF, mas também morfina e IR reduzem a área de IM, na ausência de reperfusão, sendo que não há efeito sinérgico entre TF e morfina. Esta redução não ocorre através do aumento da densidade capilar. Além disto, a ação do TF sobre a área de IM provavelmente ocorre através do estímulo de receptores opióides, visto que seu bloqueio anulou o efeito cardioprotetor do TF.

Descritores: Infarto do miocárdio, exercício, morfina, pré-condicionamento isquêmico, ratos

SUMMARY

Galvão TFG. Effects of opioids, transient ischemia, and exercise training on reduction of myocardial infarction area in rats [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007.

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Studies have shown a decrease in infarcted area in rats submitted to exercise training (ET), in the absence of reperfusion. Based on that, we tested four hypotheses: 1- not only ET but also another stimulus that causes myocardial protection, like opioid infusion and brief periods of ischemia-reperfusion (IR) before irreversible left anterior descending (LAD) coronary occlusion could reduce infarct area, 2- ET plus opioid infusion could have additive effects in reducing infarct size, 3- blocking the opioid system we could lose the myocardial protection caused by ET, 4-myocardial protection given by different strategies could occur due to the increase in capillary density. **METHODS:** Male Wistar rats (n=76) were randomly assigned to 7 groups: control (n=11); ET (n=12); morphine infusion before myocardial infarction (MI) (n=14); ET plus morphine (n=11); naloxone (a non selective opioid receptor blocker) plus morphine (n=9); intermittent IR (n=12) before MI; naloxone before each ET session (n=7). All groups were submitted to MI by LAD ligation technique and to measurement of left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) before and 5 min after MI. ET was performed on a treadmill for 60 min, 5 times/week for 12 weeks at 60% peak oxygen (peak VO₂). To evaluate the efficacy of ET, we tested the exercise capacity and the peak VO₂ before and after experimental period. Seven days after MI induction, rats were killed and hearts were harvested. Infarct size was expressed by evaluation of necrotic area, expressed as a % of the risk region (total left ventricle area). **RESULTS:** There were no differences in initial weight, cardiac/animal weight or mortality among groups. Exercise training increased exercise capacity (p=0.0001) and delta VO₂ (VO₂ peak-VO₂ rest) (p=0.0001). Inter-ventricular septum thickness was higher in the ET and ET plus morphine groups, compared to the control group (p=0.0008). The LVEDP increased in the post-MI period, for all groups (p=0.0001). All treatment groups but not morphine plus naloxone and ET plus naloxone showed a decrease in infarcted area (p=0.0001). There was no additional decrease in infarct size in the ET+ morphine group, comparing with each group alone. There was no difference in capillary density for all groups. **CONCLUSION:** Not only ET, but also morphine and IR decrease infarcted area, in the absence of reperfusion. There is no additional effect between ET and morphine. Moreover, this reduction is not due to an increase in capillary density. The effect of ET in decreasing infarct size might occur by opioid receptor stimulus.

Key words: myocardial infarction, exercise, morphine, ischemic preconditioning, rats.

INTRODUÇÃO

Epidemiologia da doença arterial coronariana

Oclusão coronariana aguda é a principal causa de morbidade e mortalidade do mundo ocidental¹ e, de acordo com a Organização Mundial de Saúde será a principal causa de morte no mundo em 2020.² Apesar do manejo desta epidemia dever centrar-se no desenvolvimento de estratégias efetivas de prevenção primária, o impacto destes programas é limitado, principalmente em países industrializados, aonde a prevalência de fatores de risco para doenças cardiovasculares é alta. Consequentemente, a fim de que seja diminuída a morbi-mortalidade da doença coronariana aguda há necessidade de estratégias efetivas de prevenção secundária e, em particular, de tratamentos que limitem a extensão do infarto em evolução, durante a fase aguda da oclusão coronariana. Atualmente, preservar a viabilidade do miocárdio isquêmico tem sido considerada a principal meta terapêutica.

Mecanismos de preservação do miocárdio isquêmico

No início da década de 70, a preservação do miocárdio isquêmico foi foco de atenção nos laboratórios de pesquisa que utilizavam modelos animais. Maroko et al.³ propuseram que várias intervenções no momento da oclusão coronariana poderiam reduzir o tamanho do infarto em cães. Nesta época, nenhuma das intervenções proposta, tais como o uso de beta-

bloqueadores,³ a infusão de insulina, glicose e potássio,⁴ ou o uso de hialuronidase,⁵ provou-se efetiva.

Entretanto, estes primeiros estudos iniciaram a busca por intervenções que pudessem limitar o tamanho do infarto. Jennings e Reimer⁶ evidenciaram que a reperfusão era essencial para proteger o miocárdio isquêmico, sendo que tal observação foi o ponto de partida que culminou com a introdução das estratégias de reperfusão (uso de trombolíticos e angioplastia primária) na prática clínica. Porém, apesar da terapia de reperfusão claramente ter reduzido o tamanho do infarto, conforme já demonstrado em estudos,¹ evidenciou-se também que a reperfusão não abolia completamente o infarto, mas principalmente retardava a progressão da necrose, como evidenciado por Chagas e col.⁷

Infelizmente, o miocárdio começa a morrer em minutos, e, na prática clínica, a dissolução do trombo em formação e a consequente reperfusão geralmente ocorrem após algumas horas, de forma que mesmo após a introdução de estratégias de reperfusão ainda há a necessidade do desenvolvimento de estratégias de cardioproteção, a fim de que ocorra a redução da área infartada, durante a ocorrência de oclusão coronariana aguda.

Pré-condicionamento isquêmico miocárdico

É interessante destacar-se que até 1986 não se sabia ainda que a limitação terapêutica do tamanho do infarto era possível. Provavelmente, o maior avanço no entendimento sobre mecanismos de sobrevivência celular

ocorreu no citado ano, quando Murry e col.⁸ descobriram um mecanismo intrínseco de proteção miocárdica, que eles denominaram de pré-condicionamento isquêmico. Neste experimento, foi observado que quatro ciclos de cinco minutos de isquemia, com reperfusão intermitente, precedendo um período de 40 minutos de isquemia, resultou em 75% de redução do tamanho do infarto. Foi também demonstrado por estes pesquisadores que esta proteção não foi resultado da abertura de colaterais, e que os efeitos protetores do pré-condicionamento isquêmico eram anulados na presença de lesão isquêmica prolongada, com duração de 3 horas.

Desde o experimento de Murry⁸ grande foco de interesse em pesquisa tem sido o fenômeno de pré-condicionamento isquêmico miocárdico e os mecanismos pelos quais este potente efeito cardioprotetor ocorre.⁹ Pré-condicionamento isquêmico foi primeiramente definido como breves períodos de oclusão da artéria coronária que protegem o miocárdio de uma lesão tecidual irreversível consequente a um período de oclusão mais prolongado.⁸ Este fenômeno tem sido observado em várias espécies, incluindo suínos,¹⁰ coelhos,¹¹ cães,¹² ratos,¹³ galinhas,¹⁴ ovelhas¹⁵ e humanos.¹⁶ Posteriormente, outros estímulos que também desencadeavam o pré-condicionamento isquêmico foram reconhecidos, incluindo hipóxia,¹⁷ estímulo cardíaco através de um marcapasso,¹⁸ estresse térmico,¹⁹ estiramento^{20,21} e vários agentes farmacológicos.^{22,23}

Apesar dos mecanismos de pré-condicionamento isquêmico ainda não serem totalmente conhecidos, muitos mediadores potenciais foram

propostos.²⁴ Estudos demonstram, por exemplo, ação da ativação pela adenosina (que é liberada durante o processo de isquemia/reperfusão) do receptor de adenosina A1, o qual acopla-se à proteína G e, através de segundos mensageiros, causa a translocação da proteína-kinase C do citoplasma para a membrana, fosforilando uma proteína que mediará a proteção.^{11,25-27} Esta proteína pode ser o canal de potássio dependente de ATP (K_{ATP}), que se torna ativado durante o pré-condicionamento isquêmico e resulta em menor duração do potencial de ação e em diminuição do influxo de cálcio, com perda de função contrátil e com efeito de economia de energia.¹² Redução na glicólise, gerando menor acidose intra-celular, é um outro potencial mecanismo.²⁸ Estudos recentes evidenciaram que diferentes agentes que mimetizam o processo de pré-condicionamento isquêmico podem atuar através de diferentes mecanismos. Em um destes experimentos, Cohen e col.²⁹ demonstraram que a acetilcolina, a bradicina, os opióides e a fenilefrina (mas não a adenosina) desencadeiam o processo de pré-condicionamento através da geração de radicais livres e da abertura de K_{ATP} mitocondriais.

A adenosina é um produto do metabolismo da purina que é liberado localmente por tecidos isquêmicos, conjuntamente com o ATP (tri-fosfato de adenosina).³⁰ O significado biológico do aumento extra-celular de adenosina está relacionado com suas propriedades como agente vasodilatador e protetor tecidual,³¹ contribuindo para a melhora do fluxo sanguíneo regional e para a auto-limitação da lesão celular local através da inibição da agregação plaquetária e da função de leucócitos polimorfonucleares. A

adenosina também reduz o consumo de oxigênio pelo músculo esquelético.³² O ATP, por sua vez, induz a vasodilatação dependente do endotélio e auxilia na preservação da integridade celular.³² Liu e col.,¹⁰ por exemplo, demonstraram que a proteção contra o infarto é mediada por receptores A1 de adenosina em corações de coelhos. Gross e Auchampach¹² observaram que o pré-condicionamento é mediado por canais de potássio sensíveis à ATP em corações de cães. Outros estímulos têm sido implicados como desencadeantes do pré-condicionamento. A hipóxia, por exemplo, mimetiza o pré-condicionamento em corações de cães.³² Mayfield e D'Alecy^{33,34} demonstraram que períodos intermitentes de hipóxia induzem uma adaptação aguda a um estresse hipóxico subsequente em ratos. Este grupo observou evidências de participação opióide neste processo de tolerância aumentada à hipóxia. Utilizando DPDPE (agonista seletivo do receptor opióide delta1) e BNTX (antagonista seletivo do receptor opióide delta1), estes pesquisadores demonstraram que o receptor opióide delta-1 atua como um mediador da adaptação ou do tempo de sobrevivência aumentado do rato a ambientes hipóxicos.

Ação de agentes opióides no pré-condicionamento isquêmico miocárdico

O sistema opióide endógeno está envolvido em muitos estados fisiopatológicos, incluindo a hipotensão,³⁵ arritmogênese³⁶ e insuficiência cardíaca congestiva.³⁷ O sistema receptor opióide também está implicado na proteção de órgãos durante eventos hipóxicos e isquêmicos.^{33,38} Mais recentemente, Chien e col.³⁸ evidenciaram que os opióides, principalmente o

agonista sintético delta-opiídeo (D-Ala2-D-Leu5), estão envolvidos em aumento de preservação tecidual e tempo de sobrevivência antes de transplantes de órgãos. Outros grupos de pesquisa também demonstraram o envolvimento de receptores opiídeos no pré-condicionamento isquêmico em ratos, através da utilização de naloxone, um antagonista não seletivo de receptor opiídeo.⁹ Chien e col.,³⁹ por exemplo, observaram que esta proteção é mediada por um ou mais receptores opiídeos, pois um isômero estéreo-seletivo de naloxone aboliu o pré-condicionamento isquêmico em coelhos. Em outro experimento, Schultz e col.⁴⁰ comprovaram que o pré-condicionamento isquêmico reduz de forma marcante o tamanho do infarto do miocárdio em ratos, sendo que tal efeito cardioprotetor pode ser completamente abolido pelo antagonista de canais de potássio sensíveis à ATP (glibenclamida). Neste estudo também verificou-se que a morfina, agonista de receptor opiídeo, mimetiza a cardioproteção induzida pelo pré-condicionamento isquêmico, e que este efeito é totalmente bloqueado através do uso de naloxone; indicando mecanismo mediado por receptor opiídeo. A abolição da cardioproteção induzida pela morfina com o uso de glibenclamida sugere um envolvimento dos canais de potássio sensíveis à ATP miocárdicos neste efeito de proteção cardíaca.

Estudos posteriores corroboram a participação dos receptores delta-opiídeos no processo de pré-condicionamento isquêmico.^{41,42} Sigg e col.,⁴³ por exemplo, comprovaram o papel dos agonistas de receptores delta-opiídeos na redução do tamanho de infarto em suínos. Na tentativa de elucidar o mecanismo de ação dos opiídeos, em relação ao processo de pré-

condicionamento isquêmico, McPherson e col.⁴⁴ desenvolveram um estudo que evidenciou que a estimulação de receptores delta-opiídeos gera radicais de oxigênio através de canais de potássio dependentes de ATP mitocondriais. Este processo, por sua vez, atenua o estresse oxidativo e a morte celular em cardiomiócitos. Tomai e col.,⁴⁵ por sua vez, têm demonstrado que em humanos os opiídeos são também capazes de mediar o pré-condicionamento isquêmico. Estes pesquisadores observaram que o naloxone pode evitar a redução do supra-desnívelamento do segmento ST, normalmente observada durante a segunda vez em que o balão é insuflado, durante angioplastia coronariana. Adicionalmente, eles evidenciaram que em pacientes tratados com naloxone, a intensidade da dor torácica e o tempo entre o início da dor e o final da segunda insuflação do balão foram similares aos da primeira insuflação, enquanto que em pacientes do grupo placebo a intensidade da dor torácica durante a segunda insuflação foi reduzida, e o tempo para o início da dor foi aumentado, em comparação com a primeira.⁴⁵ Estes dados sugerem um efeito de pré-condicionamento em humanos submetidos à angioplastia coronariana, que poderia ser atenuado através de um antagonista opiídeo. Bell e col.⁴⁶ também observaram que a estimulação dos receptores delta-opiídeos mimetiza o pré-condicionamento em trabéculas atriais de humanos, e poderia induzir proteção em uma extensão similar à obtida com o pré-condicionamento. Eles demonstraram que um agonista delta-1/delta-2, o DADLE, induziu cardioproteção contra isquemia induzida, um efeito que foi abolido pelo antagonista de canal de K dependente de ATP mitocondrial, o 5-HD.⁴⁶ De forma interessante, também

foi evidenciado que a administração de morfina a pacientes com infarto agudo do miocárdio atenuou a ativação de neutrófilos, através de um aumento na endopeptidase de neutrófilos e de uma diminuição na expressão de L-selectina e de ICAM-1.⁴⁷

Assim sendo, estes resultados sugerem que os opióides podem estar intimamente envolvidos no processo de proteção de vários tecidos e órgãos contra estímulos de hipóxia ou isquemia. Desta forma, estas comprovações podem ter importantes implicações clínicas, já que a morfina é utilizada no pré e pós-operatório em cirurgia de revascularização miocárdica e no manejo da dor em pacientes com infarto agudo do miocárdio. Estes dados também indicam que os agonistas opióides podem possuir um efeito benéfico cardioprotetor, não reconhecido previamente, em alguns destes pacientes.

Manifestações clínicas de pré-condicionamento isquêmico miocárdico

Além desses mecanismos propostos, dois fenômenos reportados, *walk-through angina* e *warm up phenomenon* podem representar uma manifestação clínica de pré-condicionamento. O fenômeno de *walk-through angina* foi primeiramente descrito no final do século XVIII⁴⁸ em um paciente que desenvolveu angina com o esforço, mas experimentou o desaparecimento paradoxal da dor com a continuação do exercício. Já o evento de *warm-up* refere-se à situação na qual o paciente cessa o exercício devido à angina, mas então é capaz de voltar a exercitar-se com poucos ou

nenhum sintoma. Ambos os fenômenos têm sido documentados com testes de exercício físico.⁴⁹ Jaffe e Quinn⁵⁰ estudaram 34 pacientes portadores de insuficiência coronariana crônica que submeteram-se a um teste de exercício inicial, seguido por 30 minutos de caminhada, 20 minutos de repouso e então uma segunda sessão de exercício. Houve menos evidências de isquemia ao eletrocardiograma (menos desvio do segmento ST) no segundo do que no primeiro teste. Okazaki e col.⁵¹ estudaram 13 pacientes com angina e compararam o resultado de dois testes de exercício consecutivos, realizados com um intervalo de 15 minutos entre si. Tais pacientes exercitaram-se mais prolongadamente antes do desenvolvimento de angina durante o segundo teste do que durante o primeiro, e também desenvolveram menor depressão do segmento ST durante o segundo teste. Apesar das variáveis hemodinâmicas e do fluxo através do sistema venoso cardíaco não diferirem entre os dois testes, o consumo de oxigênio miocárdico regional foi menor durante o segundo teste. Outra observação extremamente interessante foi o fato da liberação de adenosina dentro do sistema venoso cardíaco ter sido maior durante o segundo teste. Os pesquisadores concluíram que o fenômeno de *warm-up* é devido não a um aumento do fluxo colateral, mas a uma redução do consumo de oxigênio miocárdico, talvez mediado por receptores de adenosina A1. Observações similares com relação ao fenômeno de *warm-up* foram feitas por Willians e col.,⁵² que induziram angina com dois períodos idênticos de taquicardia induzida por marcapasso, separados por períodos de 5 a 15 minutos de recuperação. A gravidade da angina e o grau de depressão do segmento ST

foram menores durante o segundo episódio de taquicardia, e a extração de lactato diminuiu menos durante este segundo período. Similarmente aos achados em estudos prévios, o pico de fluxo sanguíneo coronário durante o segundo episódio de taquicardia não diferiu do fluxo durante o primeiro, enquanto o consumo de oxigênio miocárdico regional diminuiu durante o segundo período. Assim sendo, estes estudos sugerem que pacientes podem desenvolver tolerância súbita à angina induzida por exercício ou por taquicardia provocada. Em ao menos dois destes experimentos,^{51,52} esta tolerância parece estar relacionada não a um aumento no fluxo colateral, mas à redução do consumo de oxigênio miocárdico regional. Certamente, uma potencial explicação para estas observações é o pré-condicionamento, e a demonstração de que a liberação de adenosina foi maior durante o segundo episódio de isquemia corrobora a observação de que os receptores de adenosina parecem ser ativados durante o pré-condicionamento em alguns modelos animais.

Mecanismos celulares de pré-condicionamento isquêmico miocárdico

Tendo como base os dados expostos acima, podemos depreender que apesar de já terem sido descobertas importantes informações a respeito dos mecanismos celulares de pré-condicionamento isquêmico, há ainda muitas questões a serem respondidas. Atualmente, já é conhecido que receptores de superfície, K_{ATP} , radicais livres, e proteína kinase C desempenham papel fundamental na sinalização de sinais de proteção celular.¹ Além disto, há vários estudos conflitantes a respeito de detalhes

dos padrões de sinalização. Não é totalmente certo, por exemplo, qual tipo de K_{ATP} (K_{ATP} da superfície da membrana sarcoplasmática ou K_{ATP} mitocondrial) teria papel preponderante no pré-condicionamento isquêmico; e se o K_{ATP} desempenharia papel somente na transdução de sinais, ou se seria um efetor final do processo. Apesar de vários outros efetores finais do processo terem sido propostos, tais como os poros de transição de permeabilidade (PTP) da membrana mitocondrial, os trocadores sódio/hidrogênio, a apoptose e as *gap junctions*, há dados insuficientes para afirmar uma maior importância de algum deles, em detrimento dos outros. Dificuldade reside no fato dos estudos aprofundarem-se em campos aonde ainda não há tecnologia suficiente. Até que novas técnicas sejam desenvolvidas para permitir melhor entendimento dos PTP, dos K_{ATP} mitocondriais, ou das *gap junctions*, estas hipóteses dificilmente serão comprovadas.¹

Segunda janela de pré-condicionamento

Além destas observações, Marber e col.⁵³ descreveram uma “segunda janela de pré-condicionamento”, que é uma manifestação tardia (após 24h ou mais) a um episódio de pré-condicionamento inicial e pode envolver alguma forma de adaptação molecular, estimulando a produção de uma proteína citoprotetora, por exemplo. Evidências desta segunda janela de proteção também originaram-se dos experimentos de Kuzuya e col.,⁵⁴ que demonstraram o mesmo fenômeno de proteção miocárdica em cães 24h após curtos episódios de pré-condicionamento isquêmico. Mais

recentemente, este efeito de pré-condicionamento tardio foi sugerido por Baxter e col.⁵⁵ como sendo resultado de um mecanismo de ativação da proteína-kinase C por adenosina. Desta forma, a proteção miocárdica através do pré-condicionamento isquêmico tem sido descrita como um evento bifásico, com uma fase inicial que ocorre imediatamente após o pré-condicionamento e dura de 1 a 3 horas e uma fase tardia de proteção, que pode ser observada de 12 a 24 horas após o estímulo inicial e dura até 72 horas.⁵⁶ Se esta segunda janela for comprovadamente um fenômeno que represente uma adaptação isquêmica tardia, ela poderá ter importantes implicações clínicas. Por exemplo, um evento isquêmico, tal como a angina, que ocorra em um determinado dia, pode proteger o paciente de uma lesão isquêmica posterior no dia seguinte.

Outra potencial aplicação clínica do pré-condicionamento poderia ser o tratamento de arritmias. Vários estudos experimentais que utilizaram-se de ratos como modelos têm demonstrado que o pré-condicionamento isquêmico pode reduzir a frequência de arritmias ventriculares induzidas pelo processo de isquemia/reperfusão.^{57,58-60}

Relação entre inflamação, apoptose e pré-condicionamento isquêmico

Com o avanço dos estudos sobre pré-condicionamento isquêmico, observou-se também uma relação entre inflamação, apoptose e pré-condicionamento.⁶¹

Estudos experimentais têm demonstrado que os miócitos sofrem um processo de morte celular durante o processo de isquemia/reperfusão através de dois mecanismos: necrose e apoptose. A necrose é a principal forma de morte celular, que leva à rápida destruição dos miócitos após a isquemia miocárdica.⁶² Já a apoptose, que é a morte celular programada morfológicamente definida, pode contribuir de forma independente para a lesão irreversível dos miócitos.⁶³⁻⁶⁹ Apesar de alguns estudos terem demonstrado que a apoptose miocárdica ocorre durante a isquemia, um grande número de evidências indica que a apoptose é primariamente expressa durante a reperfusão.^{65,66,70,71} Além disto, células apoptóticas presentes em regiões adjacentes ao tecido necrótico miocárdico e cerebral têm sido associadas com a extensão do infarto no curso de reperfusão prolongada.⁷¹⁻⁷³ Os processos de necrose e apoptose ocorrem através de mecanismos essencialmente diferentes. A necrose é, em geral, uma forma de morte celular que ocorre rapidamente, e que pode desencadear uma resposta inflamatória significativa. Tipicamente, as alterações nas células incluem edema celular e das organelas, denaturação e coagulação das proteínas citoplasmáticas e quebra das organelas celulares. As alterações ultra-estruturais são relacionadas com a falta de oxigênio, depleção de ATP, perda da homeostase do cálcio e defeitos na permeabilidade da membrana. Além disto, a contração pode causar rotura da membrana e eventual morte celular.⁷⁴ Em contraste, a apoptose é um processo dependente de energia no qual a morte celular segue uma sequência programada e geneticamente controlada de eventos. Suas principais características morfológicas incluem:

perda da assimetria da membrana celular fosfolipídica, condensação da cromatina e formação de corpos citoplasmáticos. No estágio final da apoptose, fragmentos celulares formam dentro do complexo da membrana celular corpos apoptóticos que confinam conteúdos intra-celulares e impedem o início de uma resposta inflamatória.^{66,68,75} Entretanto, há cada vez mais evidências a respeito de um possível *cross-over* (isto é, uma troca do processo apoptose para necrose) entre estes dois tipos de morte celular, sob algumas condições patológicas que compartilham mecanismos similares.^{76,77} A existência de ambos os tipos de morte celular simultaneamente no miocárdio pode determinar o grau final de lesão miocárdica letal após isquemia e reperfusão.^{65,78,79} Com o avanço no conhecimento, conseqüentemente, uma inter-relação entre necrose e apoptose após o processo de isquemia/reperfusão pode oferecer novas oportunidades para que se reduza a lesão miocárdica após um evento isquêmico, tendo como objetivo clínico fundamental a redução da morbidade e da mortalidade pós-infarto. Com este objetivo, há cada vez mais estudos envolvendo o pré-condicionamento isquêmico. Através dos experimentos, já podemos concluir que os efeitos do pré-condicionamento isquêmico manifestam-se primariamente como: redução no tamanho do infarto,⁸ preservação na função endotelial^{80,81} e atenuação da resposta inflamatória mediada por neutrófilos no miocárdio envolvido.^{81,82} Apesar de haver um estudo demonstrando que o tamanho do infarto não é alterado quando se reduz o acúmulo de polimorfonucleares (PMN) através do uso de anticorpos monoclonais anti-PMN,⁸³ várias evidências têm demonstrado uma redução

na necrose através do bloqueio das interações célula a célula utilizando-se anticorpos anti-moléculas de adesão, bem como através da depleção de PMN da circulação em modelos *in vivo* de isquemia e reperfusão.⁸⁴⁻⁸⁶ Em contraste com a patogenia da necrose, o papel exato da ativação dos PMN no desenvolvimento da apoptose ainda permanece incerto. Um estudo demonstrou que a granulocitopenia não impediu a apoptose induzida pela reperfusão em um modelo de oclusão/reperfusão em coelhos,⁸³ enquanto dois estudos com um modelo de infarto em ratos evidenciaram que um acúmulo de PMN no miocárdio reperfundido está associado com um aumento na apoptose.^{65,82}

Aplicação do pré-condicionamento isquêmico miocárdico na prática clínica

Consequentemente, quando o mecanismo (ou os mecanismos) do pré-condicionamento inicial e tardio for (em) elucidado (s), agentes que mimetizem-no poderão ser administrados profilaticamente em certas situações, como na cirurgia de revascularização miocárdica ou antes da remoção do coração para transplante, por exemplo, ou possivelmente em pacientes de alto risco com angina. Estes agentes que mimetizam o pré-condicionamento isquêmico miocárdico também poderiam atuar como profilaxia de arritmias induzidas pela isquemia/reperfusão. Talvez os opióides enquadrem-se como alguns destes agentes que poderiam ser utilizados na prática clínica.

Entretanto, como já anteriormente mencionado, o trabalho de Murry⁸ não conseguiu demonstrar redução da área de infarto desencadeada pelo pré-condicionamento mediante lesão isquêmica prolongada (3 horas). Tendo como base este estudo, a maioria dos trabalhos posteriores sobre pré-condicionamento isquêmico miocárdico ocasionou isquemia miocárdica de no máximo 40 minutos, seguida por reperfusão.^{9,11,17} Todavia, as diretrizes norte-americanas para o manejo do infarto do miocárdio agudo com supradesnivelamento do segmento-ST (IAMST)⁸⁷ evidenciaram que somente 41% dos pacientes com IAMST procuraram atendimento hospitalar dentro de 2 horas de início dos sintomas, com média de atraso desde o início dos sintomas de aproximadamente 4,7 horas. Além disto, um estudo citado pelas diretrizes⁸⁸ evidenciou que um terço dos 434.877 pacientes com infarto agudo do miocárdio, confirmado no Registro Americano de Infarto do Miocárdio, compareceram ao hospital com sintomas outros que não dor torácica, sendo que tais pacientes compareceram para atendimento hospitalar com atraso desde o início dos sintomas de aproximadamente 7,9 horas. Em comparação com pacientes que procuraram atendimento hospitalar com dor torácica, os que apresentaram outros sintomas apresentaram maior probabilidade de serem mulheres, diabéticos e mais idosos, e menor probabilidade de terem o diagnóstico de infarto do miocárdio reconhecido à admissão e de receberem tratamento fibrinolítico, angioplastia primária, aspirina, beta-bloqueadores ou heparina.

Desta forma, pode-se pensar que provavelmente a aplicação de estratégia de pré-condicionamento isquêmico (por exemplo, através da administração

de opióides na sala de emergência) possa não ser útil para a grande maioria dos pacientes que procuram as unidades de emergência com quadro de infarto agudo do miocárdio, devido ao período de isquemia maior do que os 40 minutos realizados por Murry.⁸ Entretanto, alguns estudos, contrariando o trabalho de Murry,⁸ evidenciaram proteção miocárdica (através da prática de exercício físico, por exemplo), na vigência de isquemia prolongada.^{89,90} Um destes estudos,⁹⁰ por exemplo, observou que a prática de exercício físico (natação) por sete semanas antes da realização de infarto do miocárdio através da ligadura da artéria descendente anterior em ratos ocasionou redução da área infartada, aumento da densidade capilar e alteração na expressão de genes relacionados a mecanismos de adaptação ao estresse isquêmico.

Papel do treinamento físico na proteção miocárdica

Desta forma, com o objetivo de obtenção de novas estratégias de proteção miocárdica contra isquemia, outro foco de investigação é o efeito do treinamento físico sobre o sistema cardiovascular.⁹¹ Atualmente, sabe-se que o exercício muscular pode estimular a liberação de beta-endorfina, beta-lipotrofina e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), sendo todos eles sintetizados na hipófise a partir de um precursor em comum.⁹²⁻⁹⁵ O exercício físico também está correlacionado com um nível de encefalina aumentado em homogenatos de cérebro de rato.⁹⁶ Experimentos demonstram que exercício físico em ratos gera uma significativa queda da pressão arterial pós-exercício; queda esta que pode ser bloqueada com uma infusão de

naloxone antes da prática do mesmo,⁹¹ sugerindo uma modulação central da liberação de beta-endorfina pelo exercício e um envolvimento do sistema das endorfinas na regulação da pressão arterial e frequência cardíaca durante o exercício em ratos espontaneamente hipertensos. Em outros estudos, observou-se que treinamento físico de baixa intensidade gerou uma redução significativa da frequência cardíaca, do débito cardíaco e da pressão arterial (sistólica, diastólica e média) em ratos espontaneamente hipertensos, sem que tivesse ocorrido uma queda na resistência vascular periférica.⁹⁷ Também foi evidenciado que o treinamento físico de baixa intensidade causa bradicardia ao repouso e atenuação da resposta taquicárdica durante exercício progressivo em ratos espontaneamente hipertensos. Este efeito pode ser atribuído a uma significativa redução do tônus beta-adrenérgico que controla a frequência cardíaca.⁹⁸

Atualmente, o treinamento físico é amplamente utilizado na reabilitação de pacientes com doença arterial coronariana, e frequentemente ocasiona melhora da função cardiovascular.⁹⁹⁻¹⁰¹ A prática de exercício pode induzir um aumento na carga de trabalho mínima requerida para induzir depressão do segmento ST¹⁰² ou angina^{103,104} em alguns pacientes com doença arterial coronariana. Entre as adaptações ao exercício estão uma diminuição da frequência cardíaca e uma menor pressão arterial sistólica durante o exercício sub-máximo.⁶⁴ Como consequência, o consumo de oxigênio miocárdico com uma carga de exercício sub-máxima é reduzido após o treinamento.³⁰ Entretanto, em um grupo de pacientes com doença coronariana estudado por Detry e Bruce,¹⁰² a relação quantitativa entre a

depressão do segmento ST e o produto da frequência cardíaca com a pressão arterial sistólica (duplo produto) permaneceu inalterada após três meses de treinamento físico. Se o grau de depressão do segmento ST reflete a gravidade da isquemia miocárdica, esta observação fala contra uma melhora na oferta de oxigênio miocárdico e favorece a interpretação de que o limiar isquêmico aumentado após o treinamento é somente devido à redução no requerimento miocárdico de oxigênio.

Em contrapartida, Ehsani e col.¹⁰⁵ propuseram que a aparente falha no aumento da oxigenação miocárdica em resposta ao treinamento deve ter sido devida a um estímulo de exercício insuficiente. Estudos experimentais nos quais foi adotado um programa de exercício de intensidade moderada, com duração de 1 a 3 horas por dia, 5 dias por semana, demonstraram que o treinamento físico parece melhorar o suprimento sanguíneo miocárdico. Já o programa de exercício adotado em estudos nos quais o treinamento não parece melhorar a isquemia miocárdica em pacientes com doença arterial coronariana foi geralmente de intensidade leve ou moderada, e de curta duração.^{102,106,107} De fato, Ehsani e col.¹⁰⁵ demonstraram que o treinamento físico intenso (definido como exercício em intensidades progressivas, até que seja atingida a exaustão) por 12 meses gerou um aumento no consumo máximo de oxigênio e uma redução no grau de depressão do segmento ST, apesar de aumento no duplo produto máximo. Tais dados demonstram que a isquemia miocárdica é reduzida com o mesmo duplo produto (ou até com um duplo produto aumentado), como resultado da adaptação ao exercício. Estes achados sugerem que o treinamento físico com intensidade e duração

adequadas pode resultar em uma redução na isquemia miocárdica.^{89,106,108,109}

Recentemente,¹¹⁰ foram publicadas diretrizes americanas sobre exercício e atividade física na prevenção e tratamento da doença cardiovascular aterosclerótica. Este consenso define atividade física como qualquer movimento corporal produzido por músculos esqueléticos, que resulta em gasto energético além do gasto basal. Exercício é definido como atividade física planejada, estruturada e repetitiva. A intensidade absoluta do exercício reflete a taxa de energia dispendida durante tal atividade, sendo usualmente expressa em equivalentes metabólicos (METs), sendo que 1 MET equivale à taxa metabólica de repouso de 3,5ml/Kg/Min. A intensidade relativa do exercício refere-se à porcentagem da capacidade aeróbica utilizada durante sua prática e é expressa como porcentagem da frequência cardíaca máxima ou porcentagem do consumo máximo de oxigênio (VO_2 pico). Atividades com intensidade moderada são aquelas realizadas com intensidade relativa de 40% a 60% do VO_2 pico (ou com intensidade absoluta de 4 a 6 METs) e atividades com alta intensidade são aquelas praticadas com intensidade relativa maior que 60% do VO_2 pico (ou intensidade absoluta maior de 6 METs).

De acordo com este consenso,¹¹⁰ pacientes com história prévia de infarto do miocárdio submetidos a um programa de reabilitação cardíaca baseado em atividade física apresentam menor mortalidade, sem redução no risco de infarto do miocárdio recorrente, em relação a indivíduos não submetidos a este programa. Esta observação de redução na mortalidade,

sem decréscimo nas taxas de infarto do miocárdio não fatal, levanta a possibilidade do exercício físico poder aumentar a estabilidade elétrica do miocárdio, reduzindo então o risco de fibrilação ventricular; ou então reduzir a lesão miocárdica, de forma direta ou através do desencadeamento do pré-condicionamento isquêmico miocárdico.

Correlação entre condicionamento físico e pré-condicionamento isquêmico

Recentemente, estudos vêm tentando elucidar o mecanismo molecular do condicionamento físico. Capecchi e col.,¹¹¹ por exemplo, a fim de verificar a hipótese de que o condicionamento físico e o pré-condicionamento isquêmico poderiam compartilhar os mesmos aspectos biológicos, elaboraram um programa de treinamento em uma esteira, para pacientes portadores de obstrução arterial periférica. Tal programa era constituído por exercícios em intensidade sub-máxima repetidos a curtos intervalos de tempo, precedendo um teste de tolerância máxima. Neste experimento, a distância total percorrida e a distância atingida antes do surgimento da dor em membro inferior foram aferidas antes e após a conclusão do programa, assim como também foram dosados os níveis séricos de ATP, adenosina, além da atividade dos leucócitos polimorfonucleares. Neste estudo, demonstrou-se que a distância total percorrida e a distância atingida sem dor, bem como os níveis plasmáticos de adenosina e ATP, foram maiores após a conclusão do programa de treinamento. Em contrapartida, a atividade dos polimorfonucleares foi menor, ao término do mesmo. Assim sendo, este experimento demonstra que,

similarmente ao que ocorre no pré-condicionamento isquêmico miocárdico, um mecanismo mediado pela adenosina pode contribuir para o desenvolvimento do condicionamento físico. Entretanto, tal como ocorre no pré-condicionamento isquêmico, vários outros mediadores devem contribuir para o desenvolvimento do condicionamento físico. Talvez os opióides sejam alguns destes mediadores. Corroborando esta hipótese, um experimento elaborado por Domenech et al.¹¹² demonstrou que a prática de exercícios antes da oclusão coronariana em cães induziu pré-condicionamento precoce e tardio, com redução do tamanho do infarto. Neste estudo, também foi observado que o efeito precoce foi mediado por canais de K_{ATP} , o que demonstra um possível mecanismo comum de ação entre os opióides e o exercício físico, no processo de pré-condicionamento isquêmico miocárdico.

Adicionalmente, já evidenciou-se que o exercício aeróbico, além de aumentar a massa do ventrículo esquerdo, o índice cardíaco e o volume de ejeção e reduzir a frequência cardíaca de repouso,¹¹³ também ocasiona adaptações celulares, como por exemplo maior densidade mitocondrial, aumento de contratilidade de miócitos, maior sensibilidade ao cálcio e aumento da expressão e atividade de enzimas relacionadas à melhora da função cardíaca.¹¹⁴⁻¹¹⁷ Estas novas evidências talvez nos ajudem a compreender porque um estilo de vida sedentário está associado com aumento do risco de morbidade e mortalidade cardiovascular,¹¹⁸⁻¹²⁰ enquanto prática de atividade física regular e melhora da capacidade funcional estão associados com incidência reduzida de eventos coronarianos e menor frequência de infarto do miocárdio fatal.¹¹⁹⁻¹²²

Os efeitos benéficos do treinamento físico na morbidade cardiovascular já foram demonstrados, enfatizando-se as taxas de sobrevivência mais altas entre indivíduos que adquiriram um estilo de vida ativo, que incluía a prática da atividade física no dia-a-dia.¹²⁰⁻¹²² Corroborando estas observações, trabalhos experimentais evidenciaram melhora da função cardíaca e redução do tamanho do infarto em animais submetidos a treinamento físico antes da realização de infarto agudo do miocárdio (com ou sem reperfusão).^{89,112,123-125} O benefício do treinamento físico sobre a redução da área infartada, na vigência de isquemia prolongada, sem reperfusão, foi atualmente evidenciado.⁹⁰ Estes estudos que comprovaram que o treinamento físico ocasiona redução da área infartada e melhora da função ventricular na vigência de oclusão coronariana, sem reperfusão, suscitam um novo questionamento sobre os mecanismos de proteção miocárdica, visto que contrariam o trabalho clássico de pré-condicionamento isquêmico miocárdico,⁸ o qual não demonstrou proteção miocárdica ocasionada por episódios intermitentes de isquemia/reperfusão, na vigência de isquemia prolongada.

RELEVÂNCIA DO EXPERIMENTO

Visto que já foi demonstrado⁹⁰ que o treinamento físico confere redução da área infartada, mesmo sem a ocorrência de reperfusão coronariana, é pertinente questionar-nos-mos se outros estímulos que comprovadamente desencadeiam o processo de pré-condicionamento isquêmico, como a infusão de opióides e a isquemia intermitente, também não seriam capazes

de ocasionar esta redução. Esta demonstração tem importante relevância clínica, visto que pode, por exemplo, reforçar o uso de opióides na vigência de isquemia coronariana aguda, não só como adjuvante no tratamento da dor, mas também como instrumento de proteção miocárdica.

OBJETIVOS

Visto que estudos demonstraram que o treinamento físico em animais atua na redução da área de infarto do miocárdio, mesmo após oclusão coronariana definitiva, e baseando-se na comprovada ação dos agentes opióides no processo de pré-condicionamento isquêmico miocárdico (que, como já foi mencionado, é um mecanismo de cardioproteção) e na liberação de endorfinas que ocorre durante a prática de exercício físico, estabelecemos como objetivos do nosso experimento:

- 1- Esclarecer se exercício físico (esteira), infusão de opióides e ciclos de isquemia/ reperfusão intermitentes são capazes de ocasionar redução da área infartada, na ausência de reperfusão;
- 2- Determinar a presença de sinergismo entre exercício físico e agente opióide na redução da área infartada em ratos;
- 3- Elucidar se a ação do exercício físico na cardioproteção envolve estímulo de receptores opióides;
- 4- Verificar se a redução da área infartada está associada com aumento do número de capilares.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aprovação pela Comissão de Ética

Experimento aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP em sessão de 12/03/03, com o número: 983/02.

Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com idade entre 8-10 semanas. Os animais foram mantidos em biotério de manutenção do Laboratório de Fisiologia do Exercício da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, com temperatura ambiente entre 22-24°C e com ciclo claro/escuro invertido de 12 horas (início do ciclo escuro às 6:00 horas). Foram mantidos 5 animais por gaiola. Os animais foram alimentados com ração Nuvital ® (Nuvilab Nutrientes S/A, Curitiba, PR, Brasil) comprada pelo biotério e água *ad libitum*.

Grupos de tratamento

Setenta e seis ratos Wistar machos pesando no mínimo 130g no início do experimento foram utilizados. Tais animais foram divididos em sete grupos:

- 1- Grupo controle;
- 2- Grupo submetido a treinamento físico;

- 3- Grupo que recebeu morfina (100 mcg/Kg EV, sendo a infusão realizada em três períodos de cinco minutos, intercalados com três períodos de cinco minutos sem infusão) imediatamente antes da realização do infarto;
- 4- Grupo submetido a treinamento físico e infusão de morfina;
- 5-Grupo que foi submetido a três períodos de cinco minutos de oclusão da artéria descendente anterior, intercalados com três períodos (também de cinco minutos) de reperfusão, seguidos pela realização do infarto.
- 6- Grupo que recebeu naloxone (3 mg/Kg EV), um antagonista não seletivo do receptor opióide, 10 minutos antes da infusão de morfina;
- 7- Grupo que recebeu naloxone (3 mg/Kg EV) 10 minutos antes de cada dia de treinamento físico.

Protocolo de treinamento físico

Após recebimento dos animais, os mesmos foram divididos aleatoriamente entre os grupos de estudo. Os grupos sedentários foram mantidos como tal até o final das 12 semanas de treino dos grupos submetidos a treinamento físico. Nesta ocasião, os ratos sedentários foram submetidos à adaptação em esteira elétrica por 5 dias, (10 minutos ao dia, com velocidades alternantes a cada 1 a 2 minutos, entre 6 e 24 metros por minuto, com zero % de inclinação) com posterior realização de teste de distância máxima percorrida e análise do VO_2 pico. O VO_2 foi mensurado através da análise dos gases expirados durante o exercício, através do uso de equipamento Oxygen Analyzer S-3A/I (AMETEK equipamentos).(foto 1)

Nos grupos submetidos a treinamento físico, os animais, já no início do experimento foram submetidos à adaptação em esteira elétrica por 5 dias (nas mesmas condições que os grupos sedentários) com posterior realização de teste de distância máxima percorrida e análise do VO_2 pico.¹²⁶

O treinamento físico foi realizado da seguinte forma: o exercício foi executado em esteira rolante elétrica, uma hora por dia, com zero % de inclinação, 5 vezes por semana, por 12 semanas,. A velocidade e a duração do exercício foram progressivamente aumentadas no decorrer das semanas, a fim de se alcançar a velocidade correspondente à intensidade prevista (Quadro 1), que no nosso trabalho, foi estipulada por um consumo de oxigênio (Vo_2) de 60% do Vo_2 máximo. As sessões de treinamento físico foram sempre realizadas entre 8:00 e 10:00 horas da manhã, que corresponde ao início do ciclo escuro dos animais, período em que estão mais ativos. Até a sexta semana de treino, os grupos treinados atingiram velocidade final de 15 metros por minuto (velocidade equivalente a 60% do Vo_2 pico mensurado nos grupos antes do início do treinamento). Ao final desta semana, submetemos os animais à nova avaliação da distância percorrida, a fim de readequarmos a velocidade de treino. Após este teste, calculamos uma nova velocidade de treino, que foi correspondente a 60% da velocidade média atingida por cada grupo. Desta forma, nas últimas 6 semanas de treinamento, os grupos foram treinados com velocidade que variou de 21 a 24 metros por minuto.

FLUXOGRAMA

Quadro 1: Fluxograma do Experimento

Avaliação do treinamento físico

A fim de demonstrarmos que os animais foram adequadamente submetidos ao treinamento físico, os animais dos grupos treinados foram submetidos à avaliação do consumo de VO₂ e da distância máxima percorrida, antes e após o treinamento.¹²⁵ Os grupos sedentários foram submetidos à avaliação do consumo de VO₂ e da distância máxima percorrida apenas após 3 meses do início do experimento (correspondendo à análise dos animais treinados no final do treinamento).

Foto1 - Equipamento para aferição do consumo de oxigênio (VO_2) dos animais

Drogas

Durante o experimento, foram utilizados os anestésicos Xylazina e Cetamina. Também foi feito uso de morfina, naloxone, cloreto de potássio a 10% e formaldeído a 4%.

Procedimento cirúrgico

Após a realização da última sessão de treinamento físico, aguardamos 48 horas antes de submetermos os animais ao infarto

experimental, a fim de retirarmos os efeitos agudos do exercício sobre o sistema cardiovascular dos mesmos.

Todos os animais receberam anestesia com uma solução de Xylazina (Rompun®) (10 mg/Kg) e Cetamina (Ketalar®) (90 mg/Kg) administrada por via intra-peritoneal. Subsequentemente foram submetidos à inserção de um cateter em veia jugular esquerda através de incisão em região cervical anterior (a fim de que fosse obtido acesso para a infusão de morfina e naloxone) e à canulação da artéria carótida comum esquerda para aferição da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDF), sendo que tais aferições foram executadas imediatamente antes e 5 minutos após o infarto. Foi introduzida na artéria carótida comum esquerda um catéter (PE-10) até o ventrículo esquerdo. A confirmação da posição do catéter no espaço intracavitário se fez através da visualização do pulso de pressão característico (Figura 4). Para isso, o catéter arterial foi conectado a um transdutor de pressão Strain Gauge (Statham P₂₃ Db), e o sinal analógico do pulso de pressão foi amplificado (GPA-4 model 2, Stemtech, Inc.) e convertido para digital. A pressão ventricular esquerda foi registrada através do sistema AT/CODAS, batimento-a-batimento (DataQ Instruments, Inc., Ohio, USA). A frequência de amostragem foi de 1000 Hz por canal.

A PDF corresponde ao momento anterior da elevação da pressão intracavitária no momento da sístole ventricular (Figura 1). Os níveis da pressão diastólica finais correspondem a um parâmetro de função sistólica do ventrículo esquerdo, e encontram-se normalmente elevados em situações de disfunção ventricular, como durante a ocorrência de isquemia miocárdica

aguda, por exemplo. Optamos por aferir a PDF durante a realização do IAM porque a sua elevação durante o procedimento nos garante que a oclusão da coronária ocasionou lesão miocárdica. Também aferimos a PDF 5 minutos após o procedimento para avaliarmos se agudamente já havia diferença entre os grupos.

É importante salientar que todos os procedimentos cirúrgicos e todas as aferições da PDF foram realizados por uma só pessoa, a qual desconhecia quais animais eram treinados e também quais resultados seriam esperados em cada grupo.

Figura 1: Registro da pressão ventricular esquerda: onda de pressão pulsátil e intraventricular. A porção anterior da figura evidencia ponto de medida da PDF (seta) numa onda ventricular ampliada.

Após inserção do catéter em veia jugular foi realizada intubação oro-traqueal dos animais com cânula de polietileno tamanho 14. Os ratos foram ventilados utilizando-se um ventilador artificial Harvard, com um volume corrente de 1,1 ml de ar/ 100 g de peso corporal e com frequência de 70 a 75 ciclos por minuto. Em seguida, foi realizada uma toracotomia lateral através de incisão a esquerda do esterno e paralela às quarta e quinta costelas do animal, as quais foram separadas com um afastador de tórax para expor o coração. A artéria descendente anterior foi localizada através do auxílio de um microscópio e foi então realizada ligadura da mesma, na sua porção proximal, a cerca de 1 mm de sua origem, que foi alcançada através de leve afastamento do átrio esquerdo para cima, com fio de sutura de polietileno 6-0. Após a ligadura da artéria descendente anterior foi realizado o fechamento do tórax dos animais, retirada do cateter (PE-10) e da cânula de intubação, com posterior colocação dos animais em caixa aquecida e com suplementação de oxigênio, para recuperação após anestesia .

Avaliação Morfométrica

Após sete dias da realização do infarto agudo do miocárdio os animais foram anestesiados com solução de Xylazina (Rompun®) (10 mg/Kg) e Cetamina (Ketalar®) (90 mg/Kg) administrada por via intra-peritoneal.

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e uma incisão cutânea transversal foi feita estendendo-se do abdome ao tórax do animal. O

coração foi exposto e o animal foi perfundido sob pressão constante de 80 mmHg com solução fisiológica contendo cloreto de potássio (14mM). Após a constatação da parada cardíaca, a solução fisiológica foi substituída por uma solução de formol tamponado a 4%. O coração foi retirado e mantido por 24 horas em formol tamponado. Após este período, os corações foram seccionados e dispostos em cassetes plásticos do tipo processador/incluser. Os cassetes foram processados em aparelho autotécnico com ciclo total de 12 horas para a desidratação, diafanização e parafinização do material. Os tecidos incluídos em parafina foram cortados em micrótomo (3 μ m de espessura) e dispostos em lâminas. As lâminas foram observadas em microscópio ligado a sistema de digitalização de imagem (Leica Imaging Systems) e as imagens digitalizadas dos corações foram analisadas com uso de um software (ImageQuant - Leica).

Determinação da área de infarto

A área do infarto nos diferentes grupos experimentais foi quantificada através de lâminas coradas com tricrômio de Masson (Azul) e análise com uso do software (ImageQuant - Leica). A área infartada foi definida como porcentagem do ventrículo esquerdo positivo para marcação de colágeno, indicando a presença e a extensão de zona cicatricial em relação à área total do ventrículo esquerdo.

Figura 2: Pode-se observar a marcação em vermelho da área normoperfundida, e em azul a marcação de zona positiva para colágeno (coloração por Masson azul). No segundo quadro está a quantificação da área total e no terceiro, da área de infarto.

Determinação da espessura do septo inter-ventricular

A espessura do septo inter-ventricular (septo IV) nos diferentes grupos também foi quantificada através de lâminas coradas com tricrômio de Masson (Azul) e análise com uso do software (ImageQuant - Leica). Para determinarmos a espessura do septo IV, mensuramos o septo IV em sua

porção média, superior e inferior, e consideramos em todos os animais a maior destas três mensurações.

Determinação da densidade capilar

A densidade capilar no VE dos diferentes grupos experimentais foi quantificada em cortes submetidos à coloração de PAS (ácido periódico de Schiff). Foi feita a contagem do número absoluto de capilares, contados em campos aleatórios do espaço determinado para análise, sendo avaliados 20 campos da área peri-infarto, 20 campos da área infartada e 20 campos da área não infartada (60 campos por lâmina). A densidade foi calculada em função do número de campos analisados e da área de cada campo. A densidade capilar foi representada em número de capilares/mm². O espaço de análise foi definido do sulco interventricular até a parede lateral do ventrículo esquerdo. Antes de aferir a densidade capilar dos grupos do estudo, a pesquisadora foi adequadamente treinada por uma técnica experiente na metodologia, a qual pôde conferir a reprodutibilidade do método.

Aferição do peso dos animais

Os animais foram pesados no início do experimento, nos dias de realização de teste da distância máxima percorrida, nos dias de realização de aferição do VO₂, antes da realização da cirurgia, semanalmente, durante

as 12 semanas de exercício (no grupo que recebeu naloxone) e antes do sacrifício.

Análise Estatística

As variáveis foram apresentadas descritivamente em tabelas contendo média, desvio padrão, valores mínimos e máximos.

As médias das variáveis mensuradas em uma condição de avaliação foram avaliadas com análise de variância. Quando a análise mostrou-se significativa, utilizou-se o teste de Tukey para discriminar as diferenças entre grupos.

As médias das variáveis mensuradas em mais de uma condição de avaliação (pré e pós) foram avaliadas com análise de variância para medidas repetidas, as três hipóteses básicas foram testadas:

H₀₁: Os perfis de médias são paralelos, ou seja, o comportamento dos grupos é igual ao longo do tempo;

H₀₂: Os perfis de médias são coincidentes, ou seja, não existe diferença de médias entre os grupos;

H₀₃: Não há efeito de tempo, ou seja, os perfis são paralelos ao eixo das abscissas.

Os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

A comparação da mortalidade entre os grupos foi realizada através do teste da razão de verossimilhança.

RESULTADOS

Mortalidade

Não houve diferença na taxa de mortalidade pós-operatória entre os grupos (Tabela1).

Tabela 1: Taxa de mortalidade pós-operatória segundo os grupos.

GRUPO	Operado (n)	Óbito
Controle	11	36,36%
Isquemia/Reperusão	12	33,33%
Morfina+Naloxone	9	33,33%
Morfina	14	35,71%
Treino+Morfina	11	27,27%
Treino+Naloxone	7	42,86%
Treino	12	41,67%
P=0,994 (teste da razão de verossimilhança)		

Peso corporal e razão peso cardíaco/ peso corporal

Não houve diferença do peso corpóreo dos animais entre os grupos, no início do experimento (Tabela 2). No final do experimento, houve diferença de peso entre os grupos (Tabelas 3), com menor peso do grupo treino + morfina em relação ao grupo controle (tabela 4), sem diferença entre todos os outros grupos. Entretanto, não houve diferença entre os grupos no que se refere ao peso cardíaco e à relação peso cardíaco / peso corporal (Tabelas 5 e 6).

Tabela 2: Peso dos animais no início do experimento, em gramas.

Peso Inicial (g)					
GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
Controle	11	194,27	26,31	148,00	226,00
Isquemia/Reperusão	12	191,00	22,18	159,00	224,00
Morfina+Naloxone	9	191,00	13,85	172,00	218,00
Morfina	14	197,86	25,76	144,00	235,00
Treino+Morfina	11	195,45	24,93	159,00	231,00
Treino+Naloxone	7	191,57	10,72	175,00	207,00
Treino	12	201,21	32,00	135,50	231,00
P=0,9428 (análise de variância)					

Tabela 3: Peso dos animais no final do experimento (no dia do sacrifício), em gramas.

Peso (g)					
GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
Controle	7	499,26	40,75	437,50	557,00
Isquemia/Reperusão	8	459,33	26,37	413,00	494,00
Morfina+Naloxone	6	492,00	21,79	452,00	517,00
Morfina	9	462,11	33,75	397,00	510,00
Treino+Morfina	8	447,88	22,55	421,00	493,00
Treino+Naloxone	4	449,75	18,66	427,00	472,00
Treino	7	461,07	37,80	385,40	505,00
P=0,0277 (análise de variância)					

Tabela 4: Probabilidade de significância (P) do peso dos animais no final do experimento - Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos.

GRUPO	Controle	Isq/Rep	Morf+Nal	Morfina	Treino+Morf	Treino
Controle		0,2788	0,9996	0,2503	0,0443	0,2836
Isquemia/Reperusão			0,5574	1	0,9934	1
Morfina+Naloxone				0,5548	0,1546	0,5776
Morfina					0,9652	1
Treino+Morfina						0,9826
Treino+Naloxone	0,1834	0,9991	0,3841	0,9944	1	0,9973

Tabela 5- Peso cardíaco, nos diferentes grupos (g).

Peso Cardíaco(g)					
GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
Controle	7	1,64	0,19	1,36	1,88
Isquemia/Reperusão	8	1,52	0,21	1,29	1,87
Morfina+Naloxone	6	1,68	0,15	1,46	1,92
Morfina	9	1,54	0,22	1,27	1,85
Treino+Morfina	8	1,49	0,20	1,30	1,90
Treino+Naloxone	4	1,68	0,25	1,40	2,00
Treino	7	1,50	0,16	1,26	1,78
P=0,3806 (análise de variância)					

Tabela 6: Relação peso cardíaco/peso corporal (mg/g).

Relação Peso Cardíaco/Peso Corporal (mg/g)					
GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
Controle	7	3,30	0,37	2,90	3,90
Isquemia/Reperusão	8	3,30	0,24	3,04	3,79
Morfina+Naloxone	6	3,41	0,17	3,23	3,71
Morfina	9	3,33	0,27	3,00	3,70
Treino+Morfina	8	3,32	0,32	3,03	3,85
Treino+Naloxone	4	3,72	0,54	3,28	4,48
Treino	7	3,24	0,17	2,99	3,52
P=0,2910 (análise de variância)					

Tabela 6: Relação peso cardíaco/peso corporal (mg/g).*Distância máxima percorrida e consumo de oxigênio*

No decorrer das 12 semanas, notamos que há um aumento progressivo e significativo da distância total percorrida, nos grupos treinados. (Gráfico 1). Em comparação com os grupos treinados, os grupos sedentários apresentaram menor distância percorrida (Tabelas 7 e 8), maiores valores de VO_2 de repouso e menores valores de Delta VO_2 (VO_2 de pico menos VO_2 de repouso) (Tabela 9 a 12), sem diferença no VO_2 de pico. (Tabela 12).

Gráfico 1: Média e desvio padrão da distância percorrida pelos animais dos grupos treinados, ao longo das 12 semanas de treinamento, em metros. (Análise de Variância para medidas repetidas)

H_{01}	0,1092	Os perfis de médias são paralelos
H_{02}	0,8751	Os perfis de médias são coincidentes
H_{03}	0,0001	Há efeito de tempo

Tabela 7: Distância máxima percorrida (em metros), após 12 semanas.

Distância Percorrida (12 sem)					
GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
Controle	11	328,55	85,06	203,00	453,00
Isquemia+Reperusão	12	278,97	77,53	187,00	424,00
Morfina+Naloxone	9	293,54	110,50	180,00	498,65
Morfina	14	330,35	99,53	277	556,95
Treino+Naloxone	7	796,29	299,88	486,00	1310,20
Treino+Morfina	11	852,14	173,51	577,85	1119,80
Treino	12	729,39	294,00	348,00	1246,00
P=0,0001(análise de variância)					

Tabela 8: Probabilidade de significância (P) para a distância máxima percorrida (em metros), após 12 semanas, Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos.

GRUPO	Treino	Morfina	Isquemia/ Reperusão	Controle	Morfina+ Naloxone	Treino+ Naloxone
Controle					0,9995	0,0002
Isquemia/Reperusão				0,9947	1	0,0001
Morfina+Naloxone						0,0001
Morfina			0,7389	0,9679	0,8652	0,0035
Treino+Morfina	0,6737	0,0002	0,0001	0,0001	0,0001	0,9954
Treino		0,0082	0,0001	0,0002	0,0001	0,9868

Tabela 9: VO₂ de repouso entre os grupos, em mililitros/minuto/quilo.

VO2 rep					
GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
Controle	11	28,81	2,55	22,98	31,74
Isquemia/Reperusão	12	29,71	2,82	25,60	33,83
Morfina+Naloxone	9	29,23	2,79	26,95	35,06
Morfina	14	29,64	2,95	22,91	34,63
Treino+Morfina	11	23,90	3,64	19,31	33,49
Treino+Naloxone	7	24,42	2,21	22,15	27,45
Treino	12	22,98	5,69	14,74	32,39
P=0,0001(análise de variância)					

Tabela 10: Probabilidade de significância (P) para o VO₂ de repouso - Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos.

GRUPO	Morfina	Treino	Controle	Morf+Nal	Trein+Nal	Isq/Rep
Controle				1	0,1426	0,996
Morfina+Naloxone					0,1051	0,9999
Morfina		0,0003	0,9969	1	0,0301	1
Treino+Morfina	0,0023	0,9955	0,0248	0,0186	0,9999	0,0031
Treino+Naloxone						0,0338
Treino			0,0029	0,0024	0,9757	0,0003

Tabela 11- Delta VO₂ (VO₂ de pico menos VO₂ de repouso) entre os grupos, em mililitros/minuto/quilo.

Delta VO ₂					
GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
Controle	11	23,21	5,83	13,36	30,37
Isquemia/Reperusão	12	24,79	3,93	18,60	29,54
Morfina+Naloxone	9	25,46	3,45	18,01	30,51
Morfina	14	24,56	5,38	13,72	34,03
Treino+Morfina	11	30,78	4,81	25,18	41,38
Treino+Naloxone	7	30,87	3,64	27,11	36,24
Treino	12	30,01	3,54	23,33	35,56

P=0,0001(análise de variância)

Tabela 12: Probabilidade de significância (P) para o Delta VO₂ (VO₂ de pico menos VO₂ de repouso) - Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos.

GRUPO	Morfina	Treino	Controle	Morf+Nal	Treino+Nal	Isq/Rep
Controle				0,9238	0,0135	0,9801
Morfina+Naloxone					0,2239	0,9999
Morfina		0,0461	0,9893	0,9992	0,0527	1
Treino+Morfina	0,0175	0,9996	0,0037	0,1349	1	0,0343
Treino+Naloxone						0,0838
Treino			0,01	0,2647	0,9997	0,0832

Tabela 13: Valores de VO_2 de pico entre os grupos, em mililitros/minuto/quilo.

VO2 pico					
GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
Controle	11	52,02	6,11	41,35	60,73
Isquemia/Reperusão	12	54,50	3,45	50,55	62,39
Morfina+Naloxone	9	54,69	4,36	45,39	60,20
Morfina	14	54,20	4,27	44,81	58,62
Treino+Morfina	11	54,68	6,41	47,91	68,66
Treino+Naloxone	7	55,29	3,20	50,70	61,45
Treino	12	52,99	5,71	45,01	61,97
P=0,7758(análise de variância)					

PDF do ventrículo esquerdo antes e 5 minutos após realização do infarto

O gráfico 2 e a tabela 13 evidenciam que há diferença na PDF antes e 5 minutos após o infarto apenas entre os grupos isquemia/reperusão e morfina+naloxone, isquemia/reperusão e treino, e treino+morfina e morfina+naloxone. Em relação ao grupo controle, não há diferença em nenhum dos grupos, tanto antes do infarto quanto 5 minutos após sua realização. O fato da PDF antes do infarto ser igual entre os grupos, em relação ao grupo controle evidencia que não havia diferenças hemodinâmicas entre eles, até este momento. Em todos os grupos houve um aumento significativo da PDF pós-IAM, em relação à PDF pré-IAM.

Gráfico 2: Valores de PDF (antes e 5 minutos após a realização do infarto), entre os grupos, em mmHg.

***P=0,04 em relação ao grupo treino; † P=0,008 em relação ao grupo morfina + naloxone; ‡ p=0,019 em relação ao grupo treino + morfina**

Análise de Variância para medidas repetidas

H ₀₁	0,0626	Os perfis de médias são paralelos
H ₀₂	0,0020	Os perfis não são coincidentes
H ₀₃	0,0001	há efeito de tempo

Tabela 14: Probabilidade de significância para a PDF (antes e 5 minutos após a realização do infarto), em mmHg - Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos.

GRUPO	Trei+Mor	Morf+Nal	Treino+Nal	Controle	Morfina	Isq/Rep
Controle					0,9074	0,1925
Morfina+Naloxone			0,9362	0,84	0,1826	0,0083
Morfina						0,7897
Treino+Morfina		0,0194	0,4021	0,3224	0,9119	1
Treino+Naloxone				1	0,9164	0,2713
Treino	0,0945	0,9824	0,9998	0,9978	0,5673	0,0447

Área total de risco (área do ventrículo esquerdo), relação área infartada/área de risco e espessura do septo inter-ventricular

Como demonstrado nas Tabelas 14 e 15, o grupo treino+naloxone apresentou aumento de área de corte transversal do ventrículo esquerdo, em comparação com todos os outros grupos. Também observamos que, em relação ao grupo controle, todos os grupos tratados apresentaram menor relação área infartada/ área de risco, com exceção dos grupos morfina+naloxone e treino+naloxone (Gráfico 3 e Tabelas 16). Notamos também que no grupo treino+morfina não houve redução da área de infarto maior do que nos grupos treino ou morfina isolados. Em relação à espessura do septo IV, observamos que o grupo treino apresentou maior espessura do septo IV, em relação ao grupo controle (Tabelas 18 e 19). O grupo treino+morfina também apresentou maior espessura do septo IV, em relação aos grupos controle, isquemia-reperfusão e morfina. Entretanto, o grupo

treino+naloxone não apresentou diferença na espessura do septo IV, em relação aos outros grupos.

Tabela 15: Área total de risco (área de corte transversal do ventrículo esquerdo), em micrômetros.

Área Total do VE					
GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
Controle	7	53615504,00	4639827,48	48612731,00	62317869,00
Isquemia/Reperusão	8	65945540,60	11710074,70	46968124,00	80991832,00
Morfina+Naloxone	6	62043342,70	3262600,94	58091024,00	67118184,00
Morfina	9	64167840,70	8059941,78	53039388,00	76797392,00
Treino+Morfina	8	65381719,50	10971925,80	51724720,00	85185680,00
Treino+Naloxone	4	85141362,00	5692353,11	77997248,00	91086216,00
Treino	7	60562254,90	15008279,00	47852700,00	92790528,00
P=0,0008 (análise de variância)					

Tabela 16: Probabilidade de significância (P) para a área total de risco (área de corte transversal do ventrículo esquerdo), em micrômetros - Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos.

GRUPO	Treino+Morfina	Isq/Rep	Controle	Morfina	Morf+Nal	Trei+Nal
Controle				0,3394	0,7067	0,0002
Isquemia/Reperusão			0,2021	0,9998	0,9888	0,0358
Morfina+Naloxone						0,0107
Morfina					0,9996	0,0137
Treino+Morfina		1	0,2484	1	0,9952	0,0281
Treino	0,9598	0,9328	0,8294	0,9894	1	0,004

Gráfico 3: Área de infarto (área infartada/área de risco) nos diferentes grupos.

P= 0,0001(análise de variância)

***P< 0,05 vs. Controle; † P< 0,05 vs. treino+naloxone; ‡ P< 0,05 vs. treino**

Tabela 17: Probabilidade de significância (p) da área de infarto (área infartada/área de risco) - Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos.

GRUPO	Trei+Morf	Isq/Rep	Controle	Morfina	Morf+Nal	Trei+Nal
Controle				0,0373	0,9975	0,0886
Isquemia/Reperusão			0,0434	1	0,2088	0,0002
Morfina+Naloxone						0,0334
Morfina					0,1945	0,0002
Treino+Morfina		1	0,024	1	0,1336	0,0002
Treino	0,8431	0,7166	0,001	0,6763	0,0078	0,0001

Tabela 18: Espessura do septo (mm).

Espessura do septo (mm).					
GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
Controle	7	1,79	0,39	1,2	2,44
Isquemia/Reperusão	8	2,24	0,43	1,61	3,05
Morfina+Naloxone	6	2,24	0,23	2,01	2,56
Morfina	9	2,19	0,64	1,43	3,1
Treino+Morfina	8	3,13	0,4	2,46	3,66
Treino+Naloxone	4	2,79	0,4	2,28	3,24
Treino	7	2,8	1,02	1,94	4,95
P=0,00087 (análise de variância)					

**Tabela 19: Probabilidade de significância (p) da espessura do septo -
Teste de Tukey para discriminar diferenças entre os grupos.**

GRUPO	Isq/Rep	Controle	Morf+Nal	Morfina	Trei+Morf	Trei+Nal
Controle			0,7793	0,8	0,001	0,0998
Isquemia+Reperusão		0,7232	1	1	0,0476	0,7026
Morfina+naloxone				1	0,0841	0,7549
Morfina					0,0238	0,5896
Treino+Morfina						0,9565
Treino	0,4907	0,0281	0,5815	0,3544	0,9219	1

Densidade capilar

Não houve diferença significativa na densidade de capilares, entre os grupos (Tabela 20).

Tabela 20: Densidade de capilares entre os grupos (em número de capilares por mm²).

CAPILARES					
GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO
Controle	7	150,28	50,05	111,43	246,9
Isquemia- reperusão	8	196,08	22,03	114,29	176,19
Morfina	9	135,42	43,01	137,62	260
Morfina+Naloxone	6	168,06	50,74	93,33	206,9
Treino+morfina	8	146,59	38,88	106,9	230,48
Treino+ Naloxone	4	145,27	22,35	106,19	156,19
Treino	7	136,19	46,93	113,57	236,67
P=0,8830 (Análise de Variância)					

Foto 2: Secção transversal de coração de rato do grupo controle (sedentário) fixado com tricrômio de Masson.

Foto 3: Secção transversal de coração de rato do grupo de treinamento físico fixado com tricrômio de Masson.

Foto 4: Secção transversal de coração de rato do grupo que recebeu infusão de morfina fixado com tricrômio de Masson.

Foto 5: Secção transversal de coração de rato do grupo que recebeu treinamento físico e infusão de morfina fixado com tricrômio de Masson.

Foto 6: Secção transversal de coração de rato do grupo submetido à isquemia/reperfusão intermitente fixado com tricrômio de Masson.

Foto 7: Secção transversal de coração de rato do grupo que recebeu infusão de morfina + naloxone fixado com tricrômio de Masson.

Foto 8: Secção transversal de coração de rato do grupo submetido a treinamento físico e administração de naloxone fixado com tricrômio de Masson.

Foto 9: Secção transversal de coração de rato que evoluiu com óbito peri-operatório

DISCUSSÃO

Na tentativa de se reduzir a morbidade e a mortalidade associadas às doenças coronarianas, há algumas décadas vêm sendo pesquisadas estratégias que possibilitem redução da área infartada e consequente melhora da função ventricular pós-infarto. Como já mencionado, grande avanço foi conquistado com a descoberta de estratégias de reperfusão.⁶ Adicionalmente, outros mecanismos de proteção miocárdica contra lesões isquêmicas foram testados, sendo que o que demonstrou-se mais consistente foi o pré-condicionamento isquêmico miocárdico.⁸ Entretanto, como o estudo inicial com pré-condicionamento evidenciou que a proteção miocárdica contra lesão isquêmica era abolida na presença de isquemia prolongada,⁸ a maioria dos estudos subsequentes sobre este assunto utilizaram tempo de lesão isquêmica máximo de 40 minutos, seguidos por reperfusão. Todavia, sabemos que tal tempo de isquemia geralmente não corresponde ao que ocorre na prática clínica.⁸⁷ Baseado neste fato e na comprovação do efeito do treinamento físico sobre a redução da área infartada em animais submetidos à oclusão coronariana,⁸⁹ nosso estudo visou acessar a ação da infusão de opióides, do treinamento físico, da isquemia/reperfusão intermitente e da associação da infusão de opióides com treinamento físico na redução da área infartada após oclusão coronariana.

Os achados de nosso estudo, que evidenciou que tanto o treinamento físico quanto a infusão de opióides e a isquemia/reperfusão intermitente

ocasionaram redução da área infartada após oclusão coronariana, na ausência de reperfusão, e que esta redução não foi associada a aumento do número de capilares, permite que aprofundemo-nos na pesquisa dos mecanismos envolvidos em tal proteção, e também possibilita que nos questionemos se estes mecanismos são os mesmos associados com o pré-condicionamento isquêmico (que, como sabemos, envolve reperfusão miocárdica). Além disto, evidenciamos que não há efeito sinérgico, em relação à redução da área infartada, entre opióides e treinamento físico, fato este que pode significar que estes dois mecanismos de proteção miocárdica podem agir através dos mesmos receptores e das mesmas vias de ativação.

Destacamos que o fato do bloqueio dos receptores opióides ter ocasionado perda da proteção miocárdica contra isquemia causada pelo treinamento físico evidencia participação de receptores opióides no processo de redução da área infartada desencadeado pela atividade física. Este fato pode significar a conexão entre o pré-condicionamento isquêmico miocárdico e a proteção miocárdica conferida pela prática da atividade física.

As doses de drogas (anestésicos, morfina e naloxone) administradas foram doses cuja segurança de uso e aquisição do efeito desejado foram comprovados em estudos prévios.^{90,127,128} Da mesma forma, a técnica de ligadura da artéria coronária descendente anterior utilizada em nosso estudo também já foi anteriormente descrita.⁹⁰

Adicionalmente, baseamo-nos em experimentos prévios^{126,129} para elaborarmos o programa de treinamento em esteira elétrica e a avaliação do treinamento físico através do consumo de oxigênio e da distância máxima percorrida. Preferimos realizar a mensuração da distância máxima percorrida, do VO2 pico e do delta VO2, a fim de demonstrar se os grupos submetidos a treinamento físico foram adequadamente treinados, ao invés de adotarmos a técnica de dosagem de citrato sintase anteriormente descrita,¹³⁰ porque esta técnica sofre interferências, em caso de anestesia.

Nossos resultados demonstram que não houve diferença na mortalidade entre os grupos. Este dado também foi evidenciado em outros experimentos,⁹⁰ aonde o tamanho do IAM não foi correlacionado com a mortalidade peri-operatória. Este fato provavelmente ocorreu porque outros fatores, além do tamanho do IAM, colaboram para a mortalidade peri-operatória, como a ocorrência de arritmias, tromboembolismo pulmonar e infecção, por exemplo. A fim de verificarmos se os ratos que evoluíram com óbito peri-operatório apresentavam área de IAM maior que os ratos que sobreviveram, analisamos, aleatoriamente, a área de IAM de 2 ratos que foram encontrados mortos em suas caixas, constatando que as áreas de IAM eram de 11% e 17%; áreas essas que não diferiram daquelas dos ratos sobreviventes. Em um desses corações, inclusive, (foto 9), foi evidenciado um trombo em ventrículo direito, o que pode ter sido responsável pelo óbito do animal.

Não houve diferença no peso inicial dos animais. Em relação ao peso final, o fato de ter havido diferença apenas entre o grupo treino + morfina e o grupo controle, sem diferença entre os demais grupos sedentários e treinados, não nos permite afirmar que o treinamento físico altera o peso dos animais.

Estudos prévios também demonstraram que o treinamento físico não altera o peso corporal dos animais.⁹⁰ Denotamos também que não houve, entre os grupos, diferença no peso cardíaco e na relação peso cardíaco/peso corporal, o que já foi evidenciado em outros trabalhos que estudaram o efeito do treinamento físico sobre a área infartada, aonde o peso cardíaco não foi alterado pelo treinamento físico⁸⁹ e não correlacionou-se com o achado histológico de espessamento do septo inter-ventricular (que é um indicativo de hipertrofia do miocárdio não infartado, nos ratos treinados).⁹⁰ Entretanto, outros estudos¹²³ observaram aumento do peso cardíaco e da relação peso cardíaco/peso corporal em animais treinados, em comparação com o grupo sedentário.

É importante destacar, que no nosso experimento, houve aumento da espessura do septo IV nos grupos treino e treino+morfina (em relação ao grupo controle e em relação aos grupos controle, isquemia-reperfusão e morfina, respectivamente), como já demonstrado em estudos prévios, aonde⁹⁰ ratos previamente treinados apresentaram hipertrofia do miocárdio não infartado. Contudo, o grupo treino+naloxone não apresentou diferença na espessura do septo IV, em relação aos outros grupos, o que pode significar que o efeito de

hipertrofia miocárdica concêntrica ocasionado pelo treinamento físico também pode ser desencadeado por receptores opióides, visto que o seu bloqueio anulou este efeito. Além disto, talvez a ausência de correlação entre a espessura do septo IV e o peso cardíaco se deva aos dias de destreino antes do sacrifício, que foi de 9 dias no nosso experimento (2 dias de destreino antes da realização do infarto e 7 dias entre o infarto e o sacrifício) e de 4 semanas no trabalho citado.⁹⁰

No nosso experimento, verificamos que houve aumento da distância máxima percorrida e do delta VO₂, nos grupos submetidos a treinamento físico. Estes dados corroboram estudos prévios.^{126,131} Entretanto, no nosso trabalho observamos que não houve aumento do VO₂ pico nos grupos treinados, ao contrário do que foi demonstrado em outro trabalho.¹³¹ Este fato provavelmente ocorreu porque este experimento¹³¹ também evidenciou que o aumento do VO₂ pico está correlacionado com a intensidade do treinamento físico, visto que o treinamento com intensidade de 85-90% do VO₂ pico, por 10 semanas, ocasionou aumento de 71% deste parâmetro, enquanto o treinamento com intensidade de 65-70% do VO₂ pico, pelo mesmo período, ocasionou aumento deste parâmetro de 28%. Lembramos que em nosso estudo realizamos o treinamento dos animais com intensidade de 60% do VO₂ pico.

Houve, no pós-infarto imediato, aumento da PDF do ventrículo esquerdo em todos os grupos, como já foi demonstrado em outros experimentos.¹³² Este aumento demonstra que o infarto ocorreu em todos os grupos, determinando

uma disfunção imediata do ventrículo esquerdo. Não houve, em relação ao grupo controle, diferenças significantes na PDF pré e pós-infarto, o que demonstra que a diferença do tamanho do IAM em relação ao grupo controle não ocorreu devido a diferenças hemodinâmicas prévias; e que o tamanho do IAM não foi correlacionado com o grau de aumento da PDF no pós-IAM imediato. O aumento similar da PDF 5 minutos após a realização do infarto entre os grupos, em relação ao controle indica que, agudamente, a realização do infarto determinou semelhantes alterações hemodinâmicas, sendo que em todos os grupos houve aumento da PDF após o infarto (o que, em conjunto com a curva de PDF observada durante a realização do infarto, indica que em todos os grupos realmente ocorreu isquemia miocárdica).

A diferença ocorrida entre o grupo isquemia/reperfusão e os outros dois grupos provavelmente ocorreu porque no grupo isquemia/reperfusão, assim como nos outros grupos, consideramos como valor de PDF pré-IAM o valor da curva imediatamente anterior ao IAM. Entretanto, no grupo isquemia reperfusão tivemos o cuidado de aferirmos a PDF antes e após cada ciclo de isquemia reperfusão, e notamos que após cada ciclo houve uma queda progressiva da PDF, o que deve justificar esta diferença. Esta queda progressiva da PDF neste grupo, após cada ciclo de isquemia/reperfusão, pode significar maior resistência miocárdica contra a isquemia após cada ciclo, o que então geraria menor disfunção do VE na vigência de cada ciclo de isquemia subsequente.

Evidenciamos também que, no grupo treino + naloxone, houve um aumento da área total do ventrículo esquerdo, sem aumento da espessura do septo IV, em relação aos outros grupos. Estes dados chamaram nossa atenção e serão objeto de estudos posteriores, aonde visaremos determinar, através de realização de ecodopplercardiograma, se o bloqueio dos receptores opióides com naloxone, em ratos submetidos a treinamento físico, determina hipertrofia excêntrica do ventrículo esquerdo, na presença e na ausência de infarto agudo do miocárdio.

Nossas observações também reforçam a importância do treinamento físico como mecanismo de proteção cardiovascular. Os efeitos benéficos do treinamento físico sobre a morbidade cardiovascular têm sido amplamente relatados, enfatizando-se maiores taxas de sobrevivência entre pessoas que possuem um estilo de vida ativo, mas há poucos estudos que descrevam o efeito do treinamento físico sobre a performance cardíaca ou o tamanho do infarto, após um evento coronariano agudo. Um destes experimentos,⁸⁹ há 3 décadas, evidenciou redução da área infartada, 2 dias após oclusão coronariana, em ratos submetidos à natação por 5 semanas.

Outro estudo⁹⁰ a respeito da ação do exercício físico sobre a área infartada e a função ventricular após oclusão coronariana demonstrou que ratos treinados através de natação por 7 semanas antes da realização do infarto, e sacrificados 4 semanas após a realização do mesmo, apresentaram, em relação a animais sedentários e infartados, menor área infartada, maior

densidade arteriolar e modificações na expressão de genes relacionados com o metabolismo celular, o que pode contribuir para a melhora da função ventricular no processo de remodelamento após infarto agudo do miocárdio.

Ao contrário de trabalho mencionado,⁸⁹ e de outro experimento que estudou a ação da hipóxia sobre a angiogênese miocárdica,¹³³ nosso estudo não demonstrou aumento da densidade capilar nos grupos tratados, em relação ao controle. Este fato pode ter ocorrido porque, no nosso experimento, os animais submetidos a 12 semanas de treinamento físico. E, segundo já demonstrado por um estudo,¹²⁹ o treinamento físico ocasionou aumento da densidade capilar, em relação ao grupo controle, após 3 semanas de treinamento, sendo que este aumento da densidade capilar não foi mais evidenciado, após 8 e após 16 semanas de treinamento. Após 8 semanas de treino, não foi evidenciado aumento nem de densidade capilar nem de densidade arteriolar, e após 16 semanas de treino, houve aumento apenas de densidade arteriolar, em relação ao controle. É importante salientar também que no experimento⁸⁹ que evidenciou aumento da densidade capilar após treinamento físico (no caso, a natação), os ratos foram sacrificados após 5 semanas de treino.

Em relação à redução da área infartada e ao aumento da densidade capilar obtidos através da isquemia-reperfusão intermitente, um estudo evidenciou¹³⁴ que a realização de quatro ciclos curtos de isquemia-reperfusão, previamente à oclusão permanente da artéria coronária descendente anterior,

ocasionou redução significativa da área infartada, em relação ao grupo controle. Este dado também foi observado em nosso experimento. Desta forma, ambos experimentos contrariam os achados de Murry,⁸ que evidenciaram perda da cardioproteção conferida por ciclos curtos de isquemia-reperfusão, na vigência de isquemia prolongada. Contudo, ao contrário do nosso estudo, o experimento citado¹³⁴ demonstrou não só um aumento da densidade capilar no grupo submetido à isquemia intermitente antes do infarto, após 2, 4, 7, 14 e 21 dias da realização do procedimento, como também aumento na expressão de VEGF, neste grupo. Por outro lado, o estudo de Murry⁸ e estudos com angioplastia,⁴⁵ que avaliam a existência de pré-condicionamento isquêmico em humanos, evidenciaram que o pré-condicionamento isquêmico ocorre de forma independente do recrutamento de colaterais. Desta forma, os experimentos que avaliam a ação do pré-condicionamento isquêmico na redução da área infartada ainda não permitiram que se chegasse a um consenso sobre o mecanismo pelo qual o pré-condicionamento confere proteção miocárdica contra isquemia: se é a indução da angiogênese ou a redução da demanda energética do cardiomiócito.

Além dos dados citados, o fato de termos demonstrado que não só o treinamento físico como outras estratégias de proteção cardiovascular (como a infusão de opióides e a realização de isquemia/reperfusão intermitente) são capazes de ocasionar redução da área infartada na vigência de isquemia prolongada reforça a teoria da aplicabilidade clínica de mecanismos de

proteção cardiovascular contra isquemia. Esta estratégia de cardioproteção pode ser importante, por exemplo, na sala de emergência, aonde a infusão aguda de morfina, por exemplo, poderia conferir proteção miocárdica contra isquemia, enquanto o paciente aguarda a reperfusão (medicamentosa ou via angioplastia). Além disto, nosso estudo reforça a importância da prática de atividade física, não só para obtenção de redução de fatores de risco associados às doenças cardiovasculares, com a obesidade e a hipertensão arterial sistêmica, por exemplo, mas também como forma de conferir proteção miocárdica contra isquemia.

LIMITAÇÕES DO EXPERIMENTO

Não foi realizada correlação da área de infarto com a função ventricular pelo Ecodopplercardiograma.

Não foram avaliados mecanismos de redução da área infartada ocasionada pelos tratamentos. Contudo, temos a intenção de continuar com esta linha de pesquisa, e investigar estes mecanismos, em projetos futuros.

Destacamos também que o grupo treino + naloxone tem número de animais reduzido, em relação aos outros grupos, devido ao alto custo da utilização do naloxone por 12 semanas. Além disto, iniciamos este grupo com 8 animais, entretanto, durante o período de treinamento, observamos que foi inserida no grupo, inadvertidamente, uma fêmea, que foi consequentemente retirada do protocolo. Como o protocolo de treino já estava em andamento há algumas semanas, optamos por não substituir o animal.

CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados deste estudo, tomados em conjunto, demonstram que: 1- não apenas treinamento físico, mas também infusão de opióides e ciclos de isquemia/reperfusão intermitentes são capazes de ocasionar redução da área infartada, na ausência de reperfusão; 2- não há efeito adicional entre exercício físico e agente opióide na redução da área infartada em ratos; 3- a ação do exercício físico na cardioproteção provavelmente se faz através do estímulo de receptores opióides, visto que o bloqueio destes receptores anulou esta proteção; 4- a redução da área infartada ocasionada por treinamento físico, infusão de opióides e ciclos intermitentes de isquemia/reperfusão não ocorre através do aumento do número de capilares.

BIBLIOGRAFIA

1. **Yellon DM, Downey JM.** Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical Cardiology. *Physiol Rev.* 2003;83:1113-1151.
2. **Murray CJ, Lopez AD.** Alternate projections of mortality and disability by cause 1990-2220: global burden of disease study. *Lancet.* 1997;349:1498-1504.
3. **Maroko PR, Kjekshus, J.K., Sobel, B.E., et al.** Factors influencing infarct size following experimental coronary artery occlusions. *Circulation.* 1971;43:67-82.
4. **Maroko PR, Libby P, Sobel BE, et al.** Effect of glucose-insulin-potassium infusion on myocardial infarction following experimental coronary artery occlusion. *Circulation.* 1972;45:1160-1175.
5. **Maroko PR, Libby P, Bloor CM, et al.** Reduction by hyaluronidase of myocardial necrosis following coronary artery occlusion. *Circulation.* 1972;46:430-437.
6. **Jennings RB, Reimer KA.** Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effect of reperfusion of arterial blood. *Circulation.* 1983; 68 Suppl 1:I-25-I-36.
7. **Chagas AC, Pillegi F, Lopes EA, Da Luz PL.** Myocardial protection in the occlusion/reperfusion dog model: the role of ischemic necrosis vs reperfusion injury. *Braz J Med Biol Res.* 1995;28(9):951-959.
8. **Murry CE, Jennings RB, Reimer KA.** Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74:1124-1136.

9. **Schultz JJ, Rose E, Yao Z, Gross GJ.** Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol.* 1995;268:H2157-H2161.
10. **Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W.** Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res.* 1990;66:1133-1142.
11. **Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, et al.** Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation.* 1991;84:350-356.
12. **Gross GJ, Auchampach JA.** Blockade of the ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning. *Circ Res.* 1992;70:223-233.
13. **Liu Y, Downey JM.** Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am J Physiol.* 1992;263:H1107-H1112.
14. **Liang BT, Gross GJ.** Direct preconditioning of cardiac myocytes via opioid receptors and K_{ATP} channels. *Circ Res.* 1999;84:1396-1400.
15. **Burns PG, Krukenkamp IB, Calderone CA, et al.** Does cardiopulmonary bypass alone elicit myoprotective preconditioning. *Circulation.* 1995;92:447-451.
16. **Tomai F, Crea F, Gaspardone A, et al.** Ischemic preconditioning during angioplasty is prevented by glibenclamide, a selective ATP-sensitive K⁺ channel blocker. *Circulation.* 1994; 90:700-705.

-
17. **Cohen MV, Walsh RS, Goto M, Downey J.M.** Hypoxia preconditions rabbit myocardium via adenosine and catecholamine release. *J. Mol Cell. Cardiol.* 1995; 27:1527-1534.
18. **Vegh A, Szekeres L, Parratt JR.** Transient ischaemia induced by rapid cardiac pacing results in myocardial preconditioning. *Cardiovasc Res.* 1991;25:1051-1053.
19. **Koning MMG, Gho BCG, van Klaarwater E, et al.** Rapid ventricular pacing produces myocardial protection by nonischemic activation of K-ATP channels. *Circulation.* 1996;93:178-186.
20. **Cumming DVE, Heads RJ, Brand NJ, et al.** The ability of heat stress and metabolic preconditioning to protect primary rat cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol.* 1996;91:79-85.
21. **Ovize M, Kloner RA, Przyklenk K.** Stretch preconditions canine myocardium. *Am J Physiol.* 1994;266:H137-H146.
22. **Gysembergh A, Margonari H, Loufoua J, et al.** Stretch-induced protection shares a common mechanism with ischemic preconditioning in rabbit heart. *Am J Physiol.* 1998; 274:H955-H964.
23. **Yellon DM, Baxter GF, Garcia-Dorado D, et al.** Ischaemic preconditioning: present position and future directions. *Cardiovasc Res.* 1998;37:21-33.
24. **Przyklenk K, Kloner RA, Whittaker P.** Synopsis of ischemic preconditioning: what have we learned since 1986? *In. Ref.* 4:153-170.

25. **Thornton JC, Liu GS, Downey JM.** Pretreatment with pertussis toxin blocks protective effects of preconditioning: evidence for a G-protein mechanism. *J Mol Cell Cardiol.* 1993;25:311-320.
26. **Downey JM, Liu Y, Ytrehus K.** Adenosine and the antiinfarct effects of preconditioning. *In Ref .4:*137-152.
27. **Ytrehus K, Liu Y, Downey JM.** Preconditioning protects the ischemic rabbit heart by protein Kinase C activation (abstract). *FASEB J.* 1993;7:A418.
28. **Wolfe CL, Stevens RE, Vissern FLJ, Donnelly TJ.** Loss of myocardial protection after preconditioning correlates with the time course of glycogen recovery within the preconditionated segment. *Circulation.* 1993;87:881-892.
29. **Cohen MV, Yang XM, Liu GS, et al.** Acetylcholine, Bradykinin, Opioids, and Phenylephrine, but not Adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K-ATP Channels. *Circ Res.* 2001;89:273-278.
30. **Ferguson RJ, Cote P, Gauthier P, Bourassa MG.** Changes in exercise coronary sinus blood flow with training in patients with angina pectoris. *Circulation.* 1978;58:41-47.
31. **Nolewajka AJ, Kostuk WL, Rechnitzer PA, Cunningham DA.** Exercise and human collateralization: an angiographic and scintigraphic assessment. *Circulation.* 1979;60:114-121.
32. **Shizukuda YR, Mallet T, Lee SC, Downey HF.** Hypoxic preconditioning of ischaemic canine myocardium. *Cardiovasc Res.* 1992;26:534-542.

-
33. **Mayfield KP, D'Alecy LG.** Delta-1 opioid agonist acutely increases hypoxic tolerance. *J. Pharmacol Exp Ther.* 1994;268:683-688.
34. **Mayfield KP, D'Alecy LG.** Delta-1 opioid receptor dependence of acute hypoxic adaptation. *J. Pharmacol Exp Ther.* 1994;268:74-77.
35. **Holaday JW.** Cardiovascular effects of endogenous opiate systems. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.* 1983;23:541-594.
36. **Zhan ZY, Lee AYS, Wong TM.** Naloxone blocks the cardiac effects of myocardial ischemia and reperfusion in the rat isolated heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1985;12:373-378.
37. **Liang C, Imai N, Stone, CK, et al.** The role of endogenous opioids in congestive heart failure: effects of nalmefene on systemic and regional hemodynamics in dogs. *Circulation.* 1987; 74:443-451.
38. **Chien S, Oeltgen PR, Diana JN, Salley RK.** Extensión of tissue survival time in multiorgan block preparation with a delta opioid DADLE ([D-Ala², D-Leu⁵]-enkephalin). *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994;107:964-967.
39. **Chien GL, Tang Y, Van Winkle DM.** Stereospecific blockade of myocardial ischemic preconditioning by naloxone. *Circulation.* 1995; 92 (suppl. 8):I-389. Abstract.
40. **Schultz JJ, Hsu AK, Gross GJ.** Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circ Res.* 1996;78:1100-1104.
41. **Bolling SF, Badhwar MD, Schwartz CF, et al.** Opioids confer myocardial tolerance to ischemia: interaction of delta opioid agonists and antagonists. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;122:476-481.

-
42. **Sigg DC, Coles JA, Gallagher WJ, et al.** Opioid preconditioning: myocardial function and energy metabolism. *Ann Thorac Surg.* 2001;72:1576-1582.
43. **Sigg DC, Coles JA, Oeltgen PR, Iazzo A.** Role of Delta-opioid receptor agonists on infarct size reduction in swine. *Am J Physiol.* 2002;282:H1953-H1960.
44. **McPherson BC, Zhenhai Y.** Signal transduction of opioid-induced cardioprotection in ischemia-reperfusion. *Anesthesiology.* 2001;94:1082-1088.
45. **Tomai F, Crea F, Gaspardone A, et al.** Effects of naloxone on myocardial ischemic preconditioning in humans. *J Am Coll Cardiol.* 1999;33:1863-1869.
46. **Bell SP, Sack MN, Payel A, et al.** Delta-opioid receptor stimulation mimics ischemic preconditioning in human heart muscle. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:2296-2302.
47. **Wang TL, Chang H, Hung CR, Tseng YZ.** Attenuation of neutrophil and endothelial activation by intravenous morphine in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1997;80:1532-1535.
48. **Heberden W.** Letter to Medical Transactions of the College of Physicians (London). In: **Lewis, T.** Pain in muscular ischemia. *Arch Intern Med.* 1932; 49:713.
49. **MacAlpin RN, Kattus AA.** Adaptation to exercise in angina pectoris: the electrocardiogram during treadmill walking and coronary angiographic findings. *Circulation.* 1966;33:183-201.

-
50. **Jaffe MD, Quinn NK.** Warm-up phenomenon in angina pectoris. *Lancet*.1980;2:934-936.
51. **Okazaki Y, Kodama K, Sato H, et.al.** Attenuation of increased regional myocardial oxygen consumption during exercise as a major cause of warm-up phenomenon. *J Am Col Cardiol*. 1993;21:1597-1604.
52. **Willians DO, Bass TA, Gerwitz H, Most AS.** Adaptation to the stress of tachycardia in patients with coronary artery diseases: insight into the mechanism of the warm-up phenomenon. *Circulation*.1985;71:687-692.
53. **Marber MS, Latchman DS, Walker M, Yellon DM.** Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation*. 1993;88:1264-1272.
54. **Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, et al.** Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res*. 1993;72:1293-1299.
55. **Baxter GF, Marber MS, Patel VC, Yellon DM.** A second window of protection 24 hours after ischemic preconditioning may be dependent upon adenosine receptor activation [abstract]. *Circulation*.1993;88 Suppl I (Pt 2):I-101.
56. **Patel HH, Hsu AK, Peart JN, Gross GJ.** Sarcolemmal K-ATP channel triggers opioid-induced delayed cardioprotection in the rat. *Circ Res*. 2002;91(3):186-188.
57. **Li Y, Kloner RA.** The cardioprotective effects of ischemic "preconditioning" are not mediated by adenosine receptors in rat hearts. *Circulation*. 1993;87:1642-1648.

-
58. **Shiki K, Hearse DJ.** Preconditioning of ischemic myocardium: reperfusion-induced arrhythmias. *Am J Physiol.* 1987;253:H1470-1476.
59. **Hagar JM, Hale SL, Kloner RA.** Effect of preconditioning ischemia on reperfusion arrhythmias after coronary artery occlusion and reperfusion in the rat. *Circ Res.* 1991;68:61-68.
60. **Vegh A, Szekeres L, Parratt JR.** Protective effects of preconditioning of the ischemic myocardium involves cyclooxygenase products. *Cardiovasc Res.* 1990;24:1020-1023.
61. **Wang NP, Bufkin BL, Nakamura M, et al.** Ischemic preconditioning reduces neutrophil accumulation and myocardial apoptosis. *Ann Thorac Surg.* 1999;67:1689-1695.
62. **Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB.** The wave-front phenomenon of ischemic cell death.I. myocardial infarct size vs. duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation.* 1977;56:786-794.
63. **Biasucci LM, D'Onofrio G, Liuzzo G, et al.** Intracellular neutrophil myeloperoxidase is reduced in unstable angina and myocardial infarction, but its reduction is not related to ischemia. *J Am Col ICardiol.* 1996;27:611-616.
64. **Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, et al.** Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 1994;94:1621-1628.
65. **Fliss H, Gattinger D.** Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res.* 1996;79:949-956.
66. **Haunstetter A, Izumo S.** Apoptosis. Basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res.* 1998;82:1111-1129.

-
67. **Barting B, Holtz J, Darmer D.** Contribution of myocyte apoptosis to myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 1998;93:71-84.
68. **Haunstetter A, Izumo S.** Toward antiapoptosis as a new treatment modality. *Circ Res.* 2000;86:371-376.
69. **Buja LM, Entman ML.** Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease. *Circulation.* 1998;98:1355-1357.
70. **Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, et al.** Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res.* 2000;45:651-660.
71. **Umansky SR, Pisarenko OI, Serebryakova LI, et al.** Dog cardiomyocyte death induced in vivo by ischemia and reperfusion. *B.A.M.* 1996;6:227-235.
72. **Cheng W, Kajstura J, Nitahara JA, et al.** Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Exp Cel. Res.* 1996;226:316-327.
73. **Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, et al.** Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with mypcardial infarction. *Circulation.* 1996;94:1506-1512.
74. **Cotran RS, Kumar V, Collins T.** Cellular pathology I: cell injury and cell death. In: *Robbins pathologic basis of disease, Philadelphia, PA: WB Saunders.* 1999;pp:1-29.
75. **MacLellan WR, Schneider MD.** Death by design. Programmed cell death in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 1997;81:137-144.

-
76. **Umansky SR, Shapiro JP, Cuenco GM, et al.** Prevention of rat neonatal cardiomyocyte apoptosis induced by simulated in vitro ischemia and reperfusion. *Cell Death Differ.* 1997;4:608-616.
77. **Umansky SR, Tomei LD.** Apoptosis in the heart. In: Kaufmann S.H., editor. Apoptosis. Pharmacological implications and therapeutic opportunities. *Londin:Academic. Prees.* 1997; pp:383-407.
78. **Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M.** A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1998;38:291-300.
79. **James TN.** The variable morphological coexistence of apoptosis and necrosis in human myocardial infarction: significance for understanding its pathogenesis, clinical course, diagnosis and prognosis. *Coron Artery Dis.* 1998;9:291-307.
80. **DeFily DV, Chilian WM.** Preconditioning protects coronary arteriolar endothelium from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1993;265:H700-H706.
81. **Thourani VH, Nakamura M, Duarte IG, et al.** Ischemic preconditioning attenuates postischemic coronary artery endothelial dysfunction in a model of minimally invasive direct coronary artery bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;117:383-389.
82. **Nakamura M, Wang NP, Zhao ZQ, et al.** Preconditioning decreases Bax expression, PMN accumulation and apoptosis in reperfused rat heart. *Cardiovasc Res.* 2000;45:661-670.

-
83. **Tanaka M, Brooks SE, Richard VJ, et al.** Effect of anti-CD 18 antibody on myocardial neutrophil accumulation and infarct size after ischemia and reperfusion in dogs. *Circulation*. 1993;87:526-535.
84. **Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M, et al.** Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circ Res*. 1994;74:336-343.
85. **Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, et al.** Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation*. 1983;67:1016-1023.
86. **Litt MR, Jeremy RW, Weisman HF, et al.** Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 min of ischemia: evidence for neutrophil-mediated reperfusion injury. *Circulation*. 1989;80:1816-1827.
87. **Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW, et al.** ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Revise the 199 Guidelines for the Management of Patients With Acute Myocardial Infarction). 2004. Available at: <http://www.acc.org/clinical/guidelines/stemi/index.pdf>.
88. **Canto JG, Shlipak MG, Rogers WJ, et al.** Prevalence, clinical characteristics, and mortality among patients with myocardial infarction presenting without chest pain. *JAMA*. 2000;283:3223-3229.

-
- 89. McElroy CL, Gissen SS, Fishbein MC.** Exercise induced reduction in myocardial infarct size after coronary artery occlusion in the rat. *Circulation*. 1978;57:958-962.
- 90. Freimann S, Scheinowitz M, Yekutieli D, et al.** Prior exercise training improves the outcome of acute myocardial infarction in the rat: Heart structure, function, and gene expression. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:931-938.
- 91. Shyu BC, Thorén P.** Circulatory events following spontaneous muscle exercise in normotensive and hypertensive rats. *Acta Physiol Scand*. 1976;128:515-524.
- 92. Guillemin R, Ling N, Lazarus L, et al.** The endorphins, novel peptides of brain and hypophysial origin, with opiate-like activity: biochemical and biologic studies. *Ann. NY Acad Sci*. 1977;297:131-157.
- 93. Mains RE, Eipper BA, Ling N.** Common precursor to corticotropins and endorphins. *Proc Natl Acad Sc USA*. 1977;74:3014-3018.
- 94. Nakanishi S, Inoue A, Kita T, et al.** Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature*. 1979;278:423-427.
- 95. Roberts JL, Seeburg PH, Shine J, et al.** Corticotropin and beta-endorphin: construction and analysis of recombinant DNA complementary to mRNA for the common precursor. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1979;76:2153-2157.

-
96. **Christie MJ, Chesher GB, Bird KD.** The correlation between swim-stress induced antinociception and (3H) leu-enkephalin binding to brain homogenates in mice. *Pharmacol Biochem Behav.*1981;15:853-857.
97. **Véras-Silva AS, Mattos KC, Gava NS, et al.** Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1997;273:H2627-H2631.
98. **Gava NS, Véras-Silva AS, Negrão CE, Krieger EM.** Low-intensity exercise training attenuates cardiac Beta-adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1995;26:1129-1133.
99. **Hellerstein HK.** Exercise therapy in coronary disease. *Bull.NY Acad. Med.*1968;44:1028-1047.
100. **Mitchell JH.** Exercise training in the treatment of coronary heart disease. *Adv Intern Med.* 1975;20:249-272.
101. **Clausen JP.** Circulatory adjustments to dynamic exercise and effect of physical training in normal subjects and in patients with coronary artery disease. *Prog Cardiovas Dis.*1976;18:459-495.
102. **Detry JM, Bruce RA.** Effects of physical training on exertional ST-segment depression in coronary heart disease. *Circulation.* 1971;44:390-396.
103. **Redwood DR, Rosing DR, Epstein SE.** Circulatory and symptomatic effects of physical training in patients with coronary artery disease and angina pectoris. *N Engl J Med.* 1972;286:959-965.

-
104. **Sim DN, Neil WA.** Investigation of the physiological basis for increased exercise threshold for angina pectoris after physical conditioning. *J Clin Invest.* 1974;54:763-770.
105. **Ehsani AA, Heath GW, Hagberg JM, et al.** Effects of 12 months of intense exercise training on ischemic ST-segment depression in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 1981;64:1116-1124.
106. **Wyatt HL, Mitchell J.** Influences of physical conditioning and deconditioning on coronary vasculature in dogs. *J Appl Physiol.* 1978;45:619-625.
107. **Hellerstein HK, Burlando A, Hirsch EZ, et al.** Active physical reconditioning of coronary patients. *Circulation.* 1965;32 (suppl. II): II-110.
108. **Sheuer J, Tipton CM.** Cardiovascular adaptations to physical training. *Annu Rev Physiol.* 1977;39:221-251.
109. **Heaton WH, Marr KC, Capurro NL, et al.** Beneficial effect of physical training on blood flow to myocardium perfused by chronic collaterals in the exercising dog. *Circulation.* 1978; 57: 575-581.
110. **Thompson PD, Buchner D, Piña IL, et al.** Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. A statement from the Council on Clinical Cardiology (subcommittee on exercise, rehabilitation, and prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (subcommittee on physical activity). *Circulation.* 2003;107:3109-3116

-
111. **Capecchi PL, Pasini FL, Cati G, et al.** Experimental model of short-time exercise-induced preconditioning in POAD patients. *Angiology*. 1997; 48:469-480.
112. **Domenech R, Macho P, Schwarze H, Sánchez G.** Exercise induces early and late myocardial preconditioning in dogs. *Cardiovasc Res*. 2002;55:561-566.
113. **Fagard RH.** Impact of different sports and training on cardiac structure and function. *Cardiol Clin*. 1997;15:397-412.
114. **Guski H, Meerson FZ, Wassilew G.** Comparative study of ultrastructure and function of rat heart hypertrophied by exercise or hypoxia. *Exp Pathol*. 1981;20:108-120.
115. **Wisloff U, Loennechen JP, Falck G, et al.** Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovasc Res*. 2001; 50: 495-508.
116. **Tate CA, Helgason T, Hyek MF, et al.** SERCA 2a and mitochondrial cytochrome oxidase expression are increased in hearts of exercise-trained old rats. *Am J Physiol*. 1996;271:H68-H72.
117. **Jin H, Yang R, Li W, et al.** Effect of exercise training on cardiac function, gene expression and apoptosis in rats. *Am J Physiol*. 2000;279:H2994-3002.
118. **Booth FW, Chakravarthy MV, Gordon SE, et al.** Waging war on physical inactivity: using modern molecular ammunition against an ancient enemy. *J Appl Physiol*. 2002;93:3-30.

-
119. **Berlin JA, Colditz GA.** A meta-analysis of physical activity in the prevention of coronary heart disease. *Am J Epidemiol.* 1990;132:612-628.
120. **Shepard RJ, Balady GJ.** Exercise as cardiovascular therapy. *Circulation.* 1999;99:963-972.
121. **Sandvik L, Erikssen J, Thaulow E, et al.** Physical fitness as a predictor of mortality among healthy, middle-aged Norwegian men. *N Engl J Med.* 1993;328:533-537.
122. **Wagner C, Simon A, Evans J, et al.** Physical activity and coronary event incidence in Northern Ireland and France: the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME). *Circulation.* 2002;105:2247-2252.
123. **Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, et al.** Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *J Exp Med* 1999;189:1699-1706.
124. **Powers SK, Demirel HA, Vincent KH, et al.** Exercise training improves myocardial tolerance to in vivo ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol.* 1998;275:R1468-R1477.
125. **Brown BA, Jew KN, Sparagna GC, et al.** Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in the rat heart. *J Appl Physiol.* 2003;95:2510-2518.
126. **Brooks GA, White TP.** Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *Appl Physiol.* 1978;45:1009-1015.

-
127. **Wang TL, Chang H, Hung CR, Tseng YZ.** Morphine preconditioning attenuates neutrophil activation in rat models of myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 1998;40(3):557-53.
128. **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):1355-1362.
129. **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.* 1998 Sep;85:1160-8.
130. **Sheperd D, Garland PB.** Citrate synthase from rat liver. *Methods in Enzymology.* 1969;13:11-16.
131. **Kemi OJ, Haram PM, Wisloff U, Ellingsen O.** Aerobic fitness is associated with cardiomyocyte contractile capacity and endothelial function in exercise training and detraining. *Circulation.* 2004;109:2897-2904.
132. **Sasaki H, Fukuda S, Otani H, et al.** Hypoxic preconditioning triggers myocardial angiogenesis: a novel approach to enhance contractile functional reserve in rat with myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34:335-48.
133. **Anversa P, Olivetti G, Capasso JM.** Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1991;68(14): 7D-16D.

-
134. **Fukuda S, Kaga S, Sasaki H, et al.** Angiogenic signal triggered by ischemic stress induces myocardial repair in rat during chronic infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;36:547-559.

ANEXO I- Valores individuais do peso corporal (g) dos animais no início do experimento

Controle	Peso	Treino	Peso	Treino+Naloxone	Peso
15	203	1	229	90	200
16	170	2	226	91	175
17	187	4	185	92	183
18	224	5	213	94	196
19	198	6	135,5	95	207
20	217	7	168	96	188
21	166	8	205	97	192
22	148	10	231	Média	191,6
23	226	11	215	DP	9,96
24	219	12	158		
25	179	13	227		
Média	194,3	14	222		
DP	25,1	Média	201,2		
		DP	32		
Treino+morfina	Peso	Morfina	Peso	Isquemia-reperfusão	Peso
26	183	40	221	C	192
28	176	41	206	D	203
29	231	42	144	E	219
30	200	44	187	F	222
31	180	45	196	J	180
32	216	46	235	L	172
33	214	53	178	M	182
34	162	54	216	N	177
35	159	55	222	O	224
36	225	56	190	Q	166
37	204	58	230	R	159
Média	195,4	59	187	S	196
DP	24,9	60	165	Média	191
		61	193	DP	22,2
		Média	197,8		
		DP	25,7		
Morfina+Naloxone	Peso				
81	191				
82	186				
83	183				
84	172				
85	199				
86	218				
87	178				
88	190				
89	202				
Média	191				
DP	13,82				

ANEXO II- Valores individuais do peso corporal (g), peso cardíaco (g) e relação peso corporal/peso cardíaco (mg/g) no final do experimento

Treino	Peso Rato	Peso Card	Relação(mg/g)	Controle	Peso Rato	Peso Card	Relação(mg/g)
1	505	1,78	3,52	15	491	1,5	3,05
2	459,3	1,55	3,37	17	557	1,68	3,02
4	385,4	1,26	3,27	21	530	1,88	3,54
6	477,7	1,43	2,99	22	524,2	1,52	2,9
11	448,2	1,4	3,12	23	488,4	1,73	3,54
13	472,2	1,5	3,18	24	437,5	1,36	3,11
14	479,7	1,56	3,25	25	466,7	1,82	3,9
Média	461,07	1,5	3,25	Média	499,26	1,64	3,29
DP	37,8	0,16	0,17	DP	40,75	0,19	0,37
Treino+ Morfina	Peso Rato	Peso Card	Relação(mg/g)	Morfina	Peso Rato	Peso Card	Relação(mg/g)
26	429	1,3	3,03	40	424	1,29	3,04
28	421	1,32	3,13	41	463	1,44	3,11
29	448	1,67	3,73	42	464	1,39	2,99
31	466	1,41	3,02	44	397	1,27	3,2
33	493	1,9	3,85	53	467,5	1,55	3,31
34	440	1,51	3,43	54	464,5	1,52	3,27
35	441	1,37	3,11	56	510	1,85	3,63
36	445	1,46	3,28	59	491	1,8	3,66
Média	447,87	1,49	3,33	61	478	1,77	3,70
DP	22,55	0,20	0,32	Média	462,115	1,54	3,34
				DP	33,75	0,221	0,27
Treino+ Naloxone	Peso Rato	Peso Card	Relação(mg/g)	Morfina+ Naloxone	Peso Rato	Peso Card	Relação(mg/g)
90	472	1,6	3,39	Rato 81	452	1,46	3,23
91	454	1,7	3,749	Rato 83	517	1,92	3,71
92	446	2	4,489	Rato 86	501	1,7	3,39
95	427	1,4	3,28	Rato 87	498	1,64	3,29
Média	449,75	1,67	3,728	Rato 88	496	1,72	3,47
DP	18,66	0,25	0,548	Rato 89	488	1,63	3,34
Isquemia/ Reperfusão	Peso Rato	Peso Card	Relação(mg/g)	Media	Peso Rato	Peso Card	Relação(mg/g)
C	468	1,45	3,1	DP	492	1,68	3,41
D	428	1,3	3,04		21,79	0,15	0,17
J	494	1,87	3,784				
L	474	1,58	3,334				
M	464	1,56	3,364				
N	428	1,34	3,134				
Q	479	1,6	3,344				
S	413	1,29	3,124				
Média	459,33	1,52	3,304				
DP	26,37	0,21	0,244				

ANEXO III- Valores individuais da distância percorrida (m)

Treino	Pré-treino	6 semanas	12 semanas	Isquemia/ Reperusão	12 semanas
1	482	399,5	1246	C	424
2	141	830,3	560	D	263,8
4	265,8	515,5	479	E	202,05
5	393,75	818,4	580	F	218,5
6	533,3	613,8	782	J	265,4
7	651	379,35	927	L	381,15
8	255,8	877,9	451	O	346,95
10	247	748,25	348	Q	187,35
11	681	513	1063	R	326,25
12	428,5	665,4	1125	S	293,4
13	597	613,8	627	M	187
14	332,1	670,8	564,65	N	251,8
Média	417,35	637,17	729,39	Média	278,97
DP	167,43	157,22	294	DP	77,53
Treino+morfina	Pré-treino	6 semanas	12 semanas	Controle	12 semanas
26	355,05	413,5	1014	15	203
28	375,3	553,1	1005	16	293
29	300,6	648	1119,8	17	294
30	380,25	695,6	911,5	18	431
31	369,9	450,5	750,85	19	426
32	333	758,65	656,4	20	324
33	251	709,9	577,85	21	252
34	474,5	693,65	658,8	22	453
35	319,5	715,75	828,2	23	225
36	286,6	645,6	882,1	24	372
37	275	544,85	969	25	341
Média	338,24	620,8273	852,14	Média	328,54
DP	62,5	114,2546	173,504	DP	85,057
Treino+naloxone	Pré-treino	6 semanas	12 semanas	Morfina	12 semanas
90	224,1	552,55	1045,5	40	387
91	252,6	819,8	495,35	41	556,95
92	342,9	441,5	765,8	42	401
94	192,25	735,25	640,2	43	332,55
95	320,85	856,9	1310,2	45	379,35
96	255,4	270,2	486	46	414
97	275	1003,5	831	53	190,2
Média	266,16	668,53	796,29	54	255,4
DP	52,42	257,77	299,87	55	277
Morfina+naloxone	12 semanas			56	337,5
81	405,5			58	233,55
82	198,2			59	193,65
83	358,2			60	375,75
84	215,35			61	291
85	180			Média	330,35
86	245			DP	99,53
87	209,75				
88	331,2				
89	498,65				
Média	293,54				
DP	110,5				

ANEXO IV- Valores individuais de VO2 repouso, VO2 pico e delta VO2 dos ratos sedentários

Controle	VO2Rep	VO2Pico	DeltaVO2	Isquemia/ Reperusão	VO2Rep	VO2Pico	DeltaVO2
15	26,8	49,78	22,98	C	28,78	55,73	26,95
16	30,95	55,55	24,6	D	26,43	54,46	28,03
17	30,05	43,41	13,36	E	31,41	55,53	24,12
18	31,74	55,13	23,39	F	27,09	50,55	23,46
19	27,78	57,83	30,05	J	33,83	52,43	18,6
20	30,88	49,88	19	L	30,25	50,62	20,37
21	29,5	50,78	21,28	M	28,72	55,1	26,38
22	22,98	49,68	26,7	N	28,1	55,56	27,46
23	29,03	58,06	29,03	O	26,97	56,51	29,54
24	26,8	41,35	14,55	Q	25,6	53,35	27,75
25	30,36	60,73	30,37	R	32,94	62,39	29,45
Média	28,80	52,02	23,21	S	32,2	52,96	20,76
DP	2,55	6,10	5,83	Média	29,71	54,5	24,79
				DP	2,82	3,45	3,93
Morfina+							
Naloxone	VO2Rep	VO2Pico	DeltaVO2	Morfina	VO2Rep	VO2Pico	DeltaVO2
81	28,09	58,6	30,51	40	31,88	58,33	26,45
82	27,38	45,39	18,01	41	22,91	56,94	34,03
83	28,65	55,09	26,44	42	29,16	44,81	15,65
84	35,06	60,2	25,14	43	34,63	48,35	13,72
85	32,89	56,95	24,06	45	28,3	50,05	21,75
86	27,93	55,86	27,93	46	31,81	56,52	24,71
87	28,29	53,56	25,27	53	33,25	58,54	25,29
88	26,95	51,28	24,33	54	31,09	58,62	27,53
89	27,85	55,28	27,43	55	30	54,16	24,16
Média	29,23	54,69	25,46	56	28,1	58,12	30,02
DP	2,79	4,36	3,45	58	30,81	50,83	20,02
				59	27,33	55,42	28,09
				60	27,68	54,6	26,92
				61	27,96	53,49	25,53
				Média	29,64	54,2	24,57
				DP	2,95	4,27	5,39

ANEXO V- Valores individuais de VO2 repouso, VO2 pico e delta VO2 dos ratos treinados

Pré-Treino				Pós-Treino			
Treino	VO2Rep	VO2Pico	DeltaVO2	Treino	VO2Rep	VO2Pico	DeltaVO2
1	30,4	76,1	45,7	1	24,1	59,69	35,6
2	31,7	55,8	24,1	2	22,9	51,23	28,4
4	33,0	59,6	26,6	4	18,1	47,99	29,9
5	31,9	70,5	38,6	5	16,9	51,74	34,9
6	35,6	99,3	63,7	6	32,4	61,97	29,6
7	32,1	93,1	61,0	7	22,8	52,28	29,5
8	27,5	89,2	61,7	8	14,7	45,01	30,3
10	27,9	69,7	41,8	10	23,3	46,66	23,3
11	31,1	71,6	40,5	11	29,7	57,1	27,4
12	34,2	62,1	27,9	12	17,1	51,06	34,0
13	23,4	60,9	37,5	13	30,5	61,27	30,8
14	27,9	58,3	30,4	14	23,3	49,88	26,6
Média	30,6	72,18	41,6	Média	23,0	52,99	30,0
DP	3,37	14,57	14,0	DP	5,7	5,71	3,5
Treino+ Morfina				Treino+ Morfina			
VO2Rep	VO2Pico	DeltaVO2		VO2Rep	VO2Pico	DeltaVO2	
26	29,61	102,3	72,69	26	22,73	47,91	25,18
28	33,68	46,79	13,11	28	19,31	50,22	30,91
29	32,81	65,62	32,81	29	23,33	49,16	25,83
30	34,19	68,39	34,2	30	24,73	56,2	31,47
31	33,33	88,33	55	31	21,74	63,12	41,38
32	33,41	68,66	35,25	32	33,49	68,66	35,17
33	32,71	78,5	45,79	33	26,03	56,4	30,37
34	26,76	76,17	49,41	34	21,69	52,78	31,09
35	31,34	73,13	41,79	35	23,52	49,26	25,74
36	33,82	75	41,18	36	24,11	51,87	27,76
37	35,59	65,25	29,66	37	22,23	55,94	33,71
Média	32,48	73,47	40,99	Média	23,90	54,68	30,78
DP	2,45	14,07	15,32	DP	3,64	6,41	4,81
Treino+ Naloxone				Treino+ Naloxone			
VO2Rep	VO2Pico	DeltaVO2		VO2Rep	VO2Pico	DeltaVO2	
90	32,1	65,6	33,5	90	27,14	54,25	27,11
91	33,7	82,5	48,8	91	22,23	55,98	33,75
92	29,8	90	60,2	92	25,21	61,45	36,24
94	30,64	67,2	36,56	94	22,15	55,37	33,22
95	30,85	59,78	28,93	95	27,45	54,9	27,45
96	31,56	86,44	54,88	96	23,17	50,7	27,53
97	31,88	78,52	46,64	97	23,61	54,39	30,78
Média	31,50	75,72	44,21	Média	24,42	55,29	30,87
DP	1,25	11,56	11,57	DP	2,21	3,20	3,64

Anexo VI- Valores individuais da PDF pré-IAM e 5 minutos após o IAM

Treino	PDF pré	PDF pós	Controle	PDF pré	PDF pós	Isquemia/ reperusão	PDF pré	PDF pós
1	4,55	15,23	15	2,13	17,29	C	2,53	15,95
2	5,86	21,15	16	3,23	15,65	D	4,1	10,86
4	5,84	14,17	17	3,66	15,4	E	7,3	20,8
5	7,78	16,4	18	1,4	23,62	F	2,47	16,86
6	5,74	14,17	19	3,75	12,4	J	1,16	6
7	5,49	16,01	20	2,96	10,34	L	0,61	8,32
8	8,7	15,2	21	2,59	14,65	M	6,54	14,86
10	4,39	12,92	22	3,72	14,33	N	1,3	10
11	4,75	14,45	23	2,82	17,15	O	1,23	5,6
12	1,3	9,22	24	4,75	17,02	Q	1,14	12,69
13	1,21	16,95	25	2,76	18,12	R	1,16	9,35
14	3,63	16,29	Média	3,07	15,99	S	1,02	11,6
Média	4,94	15,18	DP	0,91	3,42	Média	2,55	11,91
DP	2,22	2,79				DP	2,26	4,56
Treino+ morfina	PDF pré	PDF pós	Morfina	PDF pré	PDF pós			
26	2,99	11,13	40	1,44	13,84			
28	2,32	15,14	41	6,52	15,71			
29	1,36	14,87	42	3,67	11,15			
30	1,77	14,12	43	2,99	11,22			
31	0,4	14,3	45	2,9	17,4			
32	1,02	7,16	46	0,55	11,36			
33	1,5	8,46	53	1,98	10,58			
34	4,04	16,71	54	2,8	14,81			
35	2,7	11,7	55	0,5	10,5			
36	0,48	9,18	56	1,84	15,7			
37	4,86	17,6	58	4,36	20,65			
Média	2,14	12,77	59	2,6	17,03			
DP	1,43	3,47	60	4,23	17,86			
			61	0,14	13,22			
			Média	2,61	14,36			
			DP					
Morfina+ Naloxone	PDF pré	PDF pós	Treino+ Naloxone	PDF pré	PDF pós			
81	3,6	21,1	90	2,33	14,68			
82	3,8	16,3	91	1,2	10,4			
83	4,2	24,2	92	5,52	15,52			
84	2,01	13,31	94	5,04	14,86			
85	3,83	14,95	95	1,9	21,19			
86	5,04	16,41	96	5,16	19,35			
87	3,59	17,99	97	5,71	12,41			
88	3,89	21,15	Média	3,84	15,49			
89	6,62	13,67	DP	1,94	3,74			
Média	4,06	17,67						
DP	1,24	3,75						

ANEXO VII- Valores individuais de área de IAM, área total do VE e relação área IAM/área total do VE

Treino	Área IAM	Área total	Relação	Treino+ Morfina	Área IAM	Área Total	Relação
1	8015901	92790528	0,086	31	9169358	67358552	0,136
2	7447204	47852700	0,156	35	6619142	61980912	0,107
4	3926156	61481220	0,064	36	9932579	53318980	0,186
6	2292042	59439024	0,038	33	2481212	65230696	0,038
11	1625389	51479236	0,031	34	11723144	63007064	0,186
13	2616247	52768128	0,049	26	4673910	51724720	0,090
14	2817314	58124948	0,048	28	10239533	85185680	0,120
Média	4105750	60562255	0,068	29	5197398	75247152	0,069
DP	2575761	15008279	0,042	Média	7504534	65381720	0,117
				DP	3235891	10971926	0,052
Controle	Área IAM	Área total	Relação	Morfina	Área IAM	Área Total	Relação
15	8987935	62317869	0,144	40	12058245	69881608	0,172
17	9644066	54092908	0,178	42	12388912	69687540	0,178
21	15934276	56647288	0,281	53	6670301	53205356	0,125
22	9865734	50672988	0,195	59	10089030	69341721	0,145
23	6998834	50697972	0,138	61	6905233	76797392	0,090
24	18749566	52266772	0,359	56	5589418	63099272	0,090
25	19723489	48612731	0,406	54	5284176	53039388	0,099
Média	12843414	53615504	0,24	41	10471513	63214117	0,166
DP	5162327	4295646	0,107	44	4212289	59244172	0,071
				Média	8185457	64167841	0,126
				DP	3090201	8059942	0,040
Isquemia/ Reperusão	Área IAM	Área Total	Relação	Treino+ Naloxone	Area IAM	Area Total	Relação
C	10025341	65464542	0,153	Rato 90	17820582	83492672	0,213
D	7203412	53164908	0,135	Rato 91	26105366	87989312	0,297
J	8399594	46968124	0,179	Rato 92	40677948	77997248	0,521
L	6603675	76651048	0,086	Rato 95	41509580	91086216	0,456
Q	5203346	68027192	0,076	Média	31528369	85141362	0,372
S	6562629	61779431	0,106	DP	11556409	5692353	0,142
M	10626731	74517248	0,143				
N	10036162	80991832	0,124	Morfina+ naloxone	Area IAM	Area VE	Relação
Média	8082611	65945541	0,125	Rato 81	14324560	60295044	0,237
DP	1990131	11710075	0,035	Rato 83	18194778	58091024	0,313
				Rato 86	20440994	64648892	0,316
				Rato 87	7986896	60907168	0,131
				Rato 88	14087186	67118184	0,210
				Rato 89	6949480	61199744	0,113
				Media	13663982	62043343	0,220
				DP	5373738	3262601	0,087