



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Bauru



EFEITOS PREVENTIVOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE AS PROTEÍNAS
CICLOOXIGENASE-2 (COX-2) E FATOR DE CRESCIMENTO DE VASOS
DERIVADO DO ENDOTÉLIO (VEGF) NO MUSCULO CARDÍACO EM RATOS
TRATADOS COM DEXAMETASONA.

Thiago Trevisolli Lourenço

Bauru 2011

Thiago Trevisolli Lourenço

EFEITOS PREVENTIVOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE AS PROTEÍNAS
CICLOOXIGENASE-2 (COX-2) E FATOR DE CRESCIMENTO DE VASOS
DERIVADO DO ENDOTÉLIO (VEGF) NO MUSCULO CARDÍACO EM RATOS
TRATADOS COM DEXAMETASONA.

Monografia apresentada ao Departamento
de Educação Física da Faculdade de
Ciências da Universidade Estadual Paulista
– UNESP - “Júlio de Mesquita Filho”,
campus de Bauru, para conclusão parcial
do curso de Licenciatura em Educação
Física.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso

Bauru

2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus familiares que estiveram comigo em todos os momentos e fizeram com que fosse possível a finalização de mais este projeto. Dedico também, a minha namorada Liliane que me ajudou no que foi possível e esteve comigo nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTO

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, que sem dúvida nenhuma vem trabalhando em minha vida e realizando coisas magníficas em todos estes anos. Queria agradecer também, por estar próximo a mim em todos os momentos, desde o início do curso, passando pelos estágios (SESI e SESC) que com certeza fará grande diferença em minha vida profissional, até neste momento, onde se encerra o ciclo. Além disso, obrigado pela oportunidade de ser o primeiro de minha família a poder cursar uma universidade.

Aos meus familiares, minha avó Isabel querida que cuidou de mim e que tenho muito carinho e admiração por todo esforço que já fez na vida, minha mãe Roselei e meu pai Claudinei que os amo muito e que são muito importantes na minha vida e tenho certeza, que estão extremamente orgulhosos de mim e ao meu irmão Daniel que é para mim um exemplo de superação.

Gostaria de deixar, um agradecimento especial a minha namorada Liliane, que esta comigo praticamente desde o início da faculdade. A "Pretinha" foi de extrema importância desde os momentos mais difíceis, me ajudando e me apoiando quando necessário, até nos momentos mais felizes. Por isso, agradeço a Deus por ter colocado esta pessoa tão especial na minha vida. Obrigado linda.

Agradeço também a professora Sandra, que aceitou ser minha orientadora no 4º ano de faculdade, onde eu nem sabia qual tema eu queria e estava extremamente confuso. Ela aceitou o desafio, permitiu minha entrada no Lefex e me ajudou muito nesses dois anos. Sandra muito obrigado por esta experiência de vida que você e a vivência no laboratório me proporcionaram, sei que existiram alguns conflitos, mas quero dizer que foi muito valioso para mim, obrigado. Quero agradecer também, aos amigos de Lefex, Vandão, Aline, Brunão Curintias, André, Anderson e Paula (sem vocês seria impossível a conclusão do trabalho) obrigado pela ajuda galera do bem, vocês com certeza fazem parte da minha vida e se Deus quiser do meu sucesso.

Por fim, quero deixar um agradecimento especial aos manos da educa que estiveram comigo nestes 5 longos anos de curso. O/a Ariel que foi fera d+ comigo, amigão que sempre me ajudou quando precisei, veio sempre serei grato a você pela força que me deu no SESI, quando precisar, tamu aiii meu freguês do FIFA (hehe). Tozi, Malmonge, Batata, PV, Façoni, Ronaldo (femonimo), Marcinho Guerreiro (figura), Arlindo, Rafa galera vocês foram a melhor e mais engraçada parte do curso espero poder ter a amizade de vocês para sempre se precisarem é só chamar (menos dinheiro).

GALERA, MUITÍSSIMO OBRIGADO!!!

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso corporal, do coração, ventrículo esquerdo e direito nos diferentes grupos analisados. VE, ventrículo esquerdo; VD ventrículo direito, PC, peso corporal. + vs controle, $p < 0,05$	25
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ação da Dexametazona na via inflamatória..... 11
- Figura 2:** Linha do tempo do protocolo experimental..... 18
- Figura 3A:** Comportamento do peso corporal durante as 8 semanas de treinamento físico (painel esquerdo) e no período de tratamento com dexametazona (10 dias, painel direito) e **Detalhe B:** Representa o peso corporal (g) no dia do sacrifício nos grupos sedentário controle (SC, n=9), sedentário tratado com dexametazona (SD, n=8), treinado controle (TC, n=9) e treinado tratado com dexametazona (TD, n=8). Significância: # vs início,* vs controle, p<0,05..... 21
- Figuras 4A:** Capacidade física avaliada em minutos na esteira ergométrica nos testes máximos realizados durante o protocolo experimental. Avaliações 1,2,3 e 4 correspondem aos TEM-1, TEM-2, TEM-3 e TEM-4. Nos grupos sedentário controle (SC, n=10), sedentário tratado com dexametazona (SD, n=10), treinado controle (TC, n=10) e treinado tratado com dexametazona (TD, n=10). Significância: # vs início p<0,05 * vs controle p<0,05..... 22
- Figuras 5:** Variação da distância percorrida em metros entre a realização do terceiro teste máximo (TEM-3) e o primeiro teste máximo (TEM-1) nos grupos avaliados: treinados (n=20) e sedentários (n=20). Significância: *p < 0,05..... 23
- Figura 6:** Valores de glicemia de jejum nas avaliações: 1-antes do treinamento; 2- antes tratamento e 3- após tratamento, nos diferentes grupos analisados: SC (n=10), SD (n=10), TC (n=10) e TD (n=10). Significância: # vs início do tratamento, * vs controle, + vs sedentário, p<0,05..... 24

Figura 7: Percentual da variação da glicemia de jejum ao final do tratamento com dexametasona, nos diferentes grupos analisados: SC (n=10), SD (n=10), TC (n=9) e TD (n=10). Significância: * vs controle, + vs sedentário, p<0,05..... 24

Figura 8: Painel superior. Gel representativo dos resultados de Western Blot para a proteína Ciclooxygenase 2 (COX-2) no músculo cardíaco. Painel inferior: Análise quantitativa da expressão da proteína COX-2 dos animais dos grupos sedentário controle (SC, n= 10), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=10), treinado controle (TC, n=10) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=10). Os valores representam a porcentagem em função do controle (SC)..... 26

Figura 9: Painel superior. Gel representativo dos resultados de Western Blot para a proteína VEGF (VEGF) no músculo cardíaco. Painel inferior: Análise quantitativa da expressão da proteína VEGF dos animais dos grupos sedentário controle (SC, n= 10), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=10), treinado controle (TC, n=10) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=10). Significância :* vs controle, p<0,05..... 26

RESUMO

A dexametasona (Dexa) é um glicocorticóide sintético utilizado amplamente na manipulação de diversos remédios, pelos seus comprovados benefícios no combate à inflamações e alergias. Apesar de seus benefícios, sua utilização crônica induz a diversos efeitos colaterais no organismo que incluem alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Além disso, por ser um anti-inflamatório, atua na via dos ácidos aracdônicos, reduzindo a expressão da enzima cicloxigenase (COX-2) e o fator de crescimento de vasos derivado do endotélio (VEGF) em vários tecidos. No entanto, seus efeitos no miocárdio ainda são incertos. O treinamento físico (TF), por sua vez, promove efeitos contrários aos causados pelo uso crônico da Dexa. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos preventivos do TF nos efeitos colaterais da Dexa no miocárdio. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi verificar se o TF tem a capacidade de prevenir e/ou atenuar os efeitos da Dexa na expressão protéica de COX-2 e VEGF no miocárdio. Quarenta animais foram divididos em 4 grupos: Sedentário Controle (SC), Sedentário tratado com Dexa (SD), Treinado Controle (TC) e Treinado tratado com Dexa (TD) e submetidos a um protocolo de treinamento físico na esteira por 70 dias (1 h/dia – 5 dias por semana, 60% da capacidade física) ou mantidos como sedentários. Nos últimos 10 dias, os ratos foram submetidos ao tratamento com Dexa (Decadron, 0,5mg/kg por dia, *i.p.*) ou salina. Durante o treinamento os animais foram pesados semanalmente e, durante o tratamento, diariamente. Ao final do tratamento foi feita a medida da glicemia de jejum dos animais. Os ratos foram eutanasiados com excesso de anestesia e o músculo cardíaco foi retirado, pesado, homogeneizado, centrifugado e armazenado a -20° C para análise de expressão proteica de VEGF e COX-2, pela técnica de Western Blotting. O tratamento com dexametasona determinou uma perda de peso corporal de 18% nos animais sedentários e 13% nos treinados, bem como elevou os níveis da glicemia de jejum nos sedentários (88%). O TF não foi capaz de atenuar a perda de peso corporal dos animais tratados com Dexa, mas sim o aumento de glicemia de jejum, uma vez que o grupo TD apresentou aumento de (24%, $p < 0,05$). Todos os valores comparados ao grupo SC. Dexa e treinamento não foram capazes de alterar o peso do coração nem do ventrículo esquerdo ou direito, quando normalizados pelo tamanho da tibia, mas o tratamento determinou aumento na expressão de VEGF no miocárdio dos animais sedentários, sem promover alterações nos níveis de COX-2. Além disso, a expressão protéica de VEGF estava maior também no miocárdio dos animais treinados. Os resultados sugerem que a Dexa tem um papel tecido dependente no miocárdio que é diferente dos outros tecidos, promovendo provavelmente um papel cardioprotetor. No entanto, maiores estudos são necessários para esclarecer estes efeitos.

Palavras chave: glicocorticóide sintético, cicloxigenase-2, miocárdio, treinamento físico, VEGF.

ABSTRACT

Dexamethasone (DEXA) is a synthetic glucocorticoid widely used in the handling of several drugs, for its proven benefits in fighting inflammation and allergies. Despite their benefits, their chronic use leads to several side effects that include changes in the body in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins. Moreover, being an anti-inflammatory, acts on the arachidonic acid pathway, reducing the expression of the enzyme cyclooxygenase (COX-2) and growth factor derived from the endothelium of blood vessels (VEGF) in various tissues. However, its effects on the myocardium are still uncertain. The physical training (PT), in turn, promotes effects contrary to those caused by chronic use of DEXA, however, little is known about the preventive effects of TF in the side effects of Dexa in the myocardium. Therefore, the aim of this study was to determine if the TF has the ability to prevent and / or mitigate the effects of Dexa in protein expression of COX-2 and VEGF in the myocardium. Forty animals were divided into 4 groups: sedentary control (SC), sedentary treated with Dexa (SD), trained control (TC) and Trained treated with Dexa (TD) and submitted to a protocol of physical training on the treadmill for 70 days (1 h / day - 5 days per week, 60% of physical capacity) or kept sedentary. Over the past 10 days, rats were treated with Dexa (Decadron, 0.5 mg / kg per day, ip) or saline. During training the animals were weighed weekly and during treatment daily. At the end of treatment was made to measure fasting glucose levels of animals. The rats were killed with excess anesthesia and cardiac muscle was removed, weighed, homogenized, centrifuged and stored at -20 ° C for analysis of protein expression of VEGF and COX-2 by Western blotting technique. Treatment with dexamethasone caused a weight loss of 18% in sedentary animals and 13% in trained as well as elevated levels of fasting glucose in sedentary (88%). The TF was unable to mitigate the loss in weight of animals treated with Dexa, but the increase in fasting glucose, since the TD group showed increased (24%, $p < 0.05$). All values compared to the SC group. Dexa and training were not able to alter heart weight or left ventricle or right, when normalized by the size of the tibia, but the treatment resulted in an increase in VEGF expression in the myocardium of sedentary animals, without causing changes in the levels of COX-2. In addition, the protein expression of VEGF was also higher in the myocardium of the trained animals. The results suggest that DEXA has a role dependent on the myocardial tissue that is different from other tissues, probably promoting a cardioprotective role. However, further studies are needed to clarify these effects.

Keywords: synthetic glucocorticoid, heart, cyclooxygenase-2, physical training, VEGF.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Avaliação da capacidade física máxima dos animais	16
3.2 Grupos experimentais	17
3.3 Protocolo de treinamento físico	17
3.4 Protocolo de tratamento e medida de glicemia	18
3.5 Retirada do coração	18
3.6 Protocolo de dosagem de proteína	19
3.7 Procedimentos de western blotting	19
3.8 Métodos estatísticos	20
4. RESULTADOS	21
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

O Cortisol é o principal glicocorticóide circulante no ser humano e é um hormônio secretado pela região cortical das glândulas supra renais. Sua síntese é regulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que é liberado pela hipófise em resposta à liberação do neuropeptídeo denominado fator liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo. Os glicocorticóides possuem várias ações fisiológicas e também atuam no processo de ajuste do organismo em situações de estresse, tais como “luta ou fuga” e exercício muito prolongado. Este hormônio possui papel fundamental no metabolismo de proteínas e lipídeos, liberando aminoácidos e ácidos graxos livres para serem utilizados como fonte energética e poupando assim os carboidratos.

A Dexametasona é um glicocorticóide produzido sinteticamente que atualmente tem sido altamente indicada pela sua eficácia no tratamento de doenças auto-imunes, na prevenção de rejeições de enxertos e transplantes, possuindo ação antiinflamatória e antialérgica. No entanto, uma única dose de dexametasona pode ser capaz de causar uma alteração significativamente no metabolismo glicolítico cardíaco, de ácidos graxos livres em animais (QI et al., 2004) e produzir tolerância à glicose em humanos (SCHNEITER e TAPPY, 1998). Por outro lado, o uso crônico desta droga promove diversos efeitos colaterais como, por exemplo, perda de peso corporal (AHTIKOSKI et al., 2004; BAREL et al., 2010; DIONISIO et al., 2010; DE VRIES et al., 2002; PINHEIRO et al., 2009) e muscular (PINHEIRO et al., 2009; AHTIKOSKI et al., 2004; BAREL et al., 2010), resistência periférica à insulina (PAULI et al., 2006; RAFACHO et al., 2007; BAREL et al., 2010; SEVERINO et al., 2002; SANTOS et al., 2007) acompanhada de hiperinsulinemia (SEVERINO et al., 2002; SANTOS et al., 2007; RAFACHO et al., 2007; DIONISIO et al., 2010), hiperglicemia (SANTOS et al., 2007; BAREL et al., 2010; RAFACHO et al., 2007; DIONISIO et al., 2010; PINHEIRO et al., 2009), redução significativa do conteúdo de glicogênio muscular (BAREL et al., 2010) e aumento do glicogênio hepático (SANTOS et al., 2007), lipólise acelerada (PINHEIRO et al., 2009), determinado aumento nos conteúdos plasmáticos de colesterol, lipoproteínas de baixa densidade, lipoproteínas de muito baixa densidade e triglicérides (SANTOS et al., 2007; SEVERINO et al., 2002; PINHEIRO et al., 2009), disfunção endotelial (SEVERINO et al., 2002) e

esteatose hepática, pelo aumento da quantidade de gordura no fígado. (SANTOS et al., 2007; PINHEIRO et al., 2009).

Tem sido mostrado também que por ser um potente antiinflamatório, a dexametasona inibe a produção de prostaglandina E2 (SHIMPO et al., 2009) e de fator de crescimento de vasos derivado do endotélio (VEGF), (BAREL et al., 2010). Dados recentes de nosso laboratório (BAREL et al., 2010) demonstraram que 10 dias de tratamento com dexametasona numa dose de 1 mg/Kg/dia reduziu em cerca de 23% dos níveis de VEGF no músculo esquelético e aproximadamente 35% no miocárdio. No entanto, os mecanismos envolvidos nesta redução ainda não são totalmente compreendidos. Uma hipótese é que por atuar na via inflamatória, a dexametasona aumenta a lipocortina-1 e diminui a fosfolipase A (ANTI et al., 2008). O aumento da lipocortina diminui a expressão da Ciclooxygenase-2, inibindo a formação dos substratos oriundos dos Ácidos Araquidônicos. Esta redução dos produtos do metabolismo do Ácido Araquidônico também é promovida pela redução da fosfolipase A. Neste sentido a formação de Prostaglandina-2 (PGE₂) é menor, o que possivelmente explica parte da redução da expressão protéica do VEGF (BANDO et al., 2009) demonstrado na figura 1.

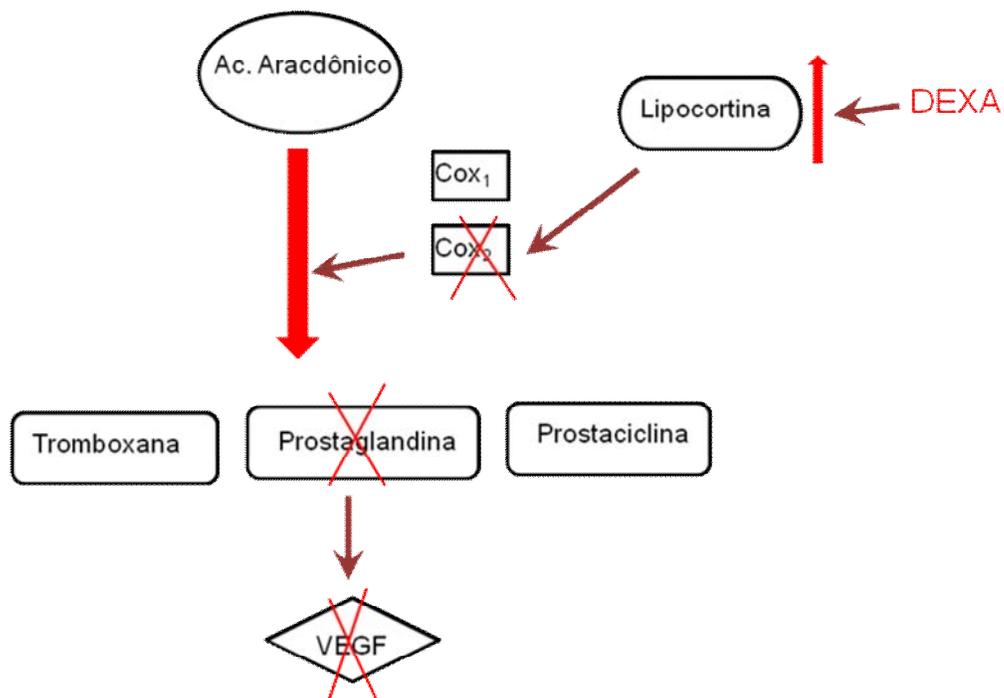


Figura 1: Ação da Dexametasona na via inflamatória.

As Ciclooxygenases são enzimas que agem na via inflamatória e possuem duas isoformas Ciclooxygenase-1 (COX-1) e Ciclooxygenase-2 (COX-2). Ambas as formas possuem peso molecular de 74kDa com 63% de homologia em humanos. COX-1 é uma enzima constitutiva, nas células. Está sempre presente na circulação sanguínea, sendo responsável por sintetizar as prostaglandinas. Já a atividade da COX-2 é dependente de um estímulo para a sua produção, sendo que, ao fim deste estímulo sua atividade é cessada. A proteína COX-2 está intimamente ligada com a inflamação, pois, é parte importante na cascata de acontecimentos da via inflamatória, além de estar envolvida no controle do crescimento celular, ovulação, angiogênese necessária à placenta e possivelmente na transmissão nervosa. (VANE et al., 1998). O uso de drogas antiinflamatórias como a Dexametasona pode inibir a atividade dessas isoformas prejudicando assim, processo inflamatório.

O VEGF é uma glicoproteína ativa que possui peso molecular de 46kDa. Além disso, é considerado um polipeptídeo secretado por um grande número de células, além de ser mitogênico para células endoteliais e induzir a angiogênese in vivo (FERRARA et al., 1992). O VEGF em humanos, pode ser encontrado em 5 diferentes formas, as quais são compostas por 121, 145, 165, 189 e 206 aminoácidos, respectivamente, sendo que, o VEGF₁₆₅ é a espécie molecular predominante e a principal isoforma, mas transcrições que codificam o VEGF₁₈₉ são também comumente encontradas em células que expressam o gene VEGF (HOUK et al., 1992; ZACHARY, 2001). Já a isoforma do VEGF₁₂₁ é uma proteína livremente difusível (PARK et al., 1993). Por outro lado, VEGF₁₄₅ é a maior variante de diversas linhas celulares tumorais originadas de órgãos reprodutores femininos e o VEGF₂₀₆ é uma forma rara. Diversas evidências têm demonstrado que o VEGF está envolvido na regulação de processos angiogênicos fisiológicos e patológicos in vitro (OTANI et al, 1998 e ZHENG et al, 2001) e in vivo (HUDLICKA et al, 1992; FERRARA et al, 1992 e FERRARA, 1999; RICHARDSON et al, 2000; AMARAL et al, 2001a,b e c). A angiogênese é um considerado processo complexo e que possui várias etapas que são reguladas por moléculas que induzem ou inibem a neovascularização (CARLILE et al., 2001; POLVERINI 2002).

Já é sabido que o exercício físico, praticado com intensidade leve a moderada, trás benefícios significativos para a saúde, principalmente com efeitos opostos aqueles demonstrados com o tratamento crônico com dexametasona. Tem sido demonstrado que o exercício físico melhora os quadros de hiperglicemia e

hiperinsulinêmica (BAREL et al., 2010; PINHEIRO et al., 2009; PAULI et al., 2005), por melhorar a resistência periférica a insulina (PAULI et al., 2005, DIONISIO et al., 2010; BAREL et al., 2010), promover melhor controle sobre o perfil lipídico (PAULI et al., 2005; PINHEIRO et al., 2009), melhorar a disfunção endotelial, por aumentar a expressão de eNOS e aumentar a biodisponibilidade de NO, controlar os níveis pressóricos elevados (AMARAL et al., 2000, 2001) e aumentar a expressão de PGE₂ (LAMBERG et al., 2003) e VEGF (AMARAL et al., 2001), promovendo maior vasodilatação e angiogênese, tanto na musculatura esquelética (OLFERT et al., 2001; LLOYD et al., 2001, Amaral et al., 2008) quanto na cardíaca (Amaral et al., 2000, MELO et al., 2003, BAREL., 2010).

Apesar dos efeitos do exercício físico estarem bem estabelecidos, quase nada se sabe acerca de seus efeitos preventivos do exercício físico sobre os efeitos colaterais da dexametasona. PAULI et al (2006) e PINHEIRO et al (2009) demonstram alguns efeitos do exercício quando o mesmo era praticado concomitante ao tratamento com Dexametasona. O treinamento aeróbio foi capaz de diminuir a resistência periférica à insulina, melhorou a captação de glicose pelo músculo, diminuiu os depósitos de gorduras (PAULI et al., 2006), diminuiu o aumento da glicemia, preveniu o aparecimento de colesterol considerado ruim, LDL, VLDL e triglicérides, preveniu hipotrofia no músculo esquelético, a esteatose hepática e diminuiu os índices de risco cardiometabólicos (PINHEIRO et al., 2009).

Recentemente demonstramos que a dexametasona em altas doses (1mg/kg/dia) foi responsável por diminuir significativamente a expressão de VEGF na musculatura cardíaca e o exercício físico, realizado previamente e concomitantemente ao tratamento não foi capaz de prevenir este efeito. Além disso, a via responsável por esta redução não foi estabelecida. Este projeto tem como hipótese que um dos mecanismos responsáveis por esta redução seja via COX-2 e PGE₂ e que os efeitos colaterais de doses mais baixas de Dexametasona possam ser prevenidos pelo exercício.

LANGBERG et al (2003) já haviam mostrado que o exercício físico era capaz de aumentar os níveis de PGE₂. Estes autores observaram que a COX-2 era fundamental para o aumento de PGE₂, uma vez que seu bloqueio evitou o aumento desta proteína durante o exercício. Além disso, foi constatado também que o bloqueio de COX1 e COX2 foi eficaz em inibir o aumento do fluxo sanguíneo na musculatura esquelética durante o exercício, demonstrando que, tanto COX-1

quanto COX-2 estavam diretamente ligadas ao aumento de fluxo sanguíneo durante o exercício.

Poucos trabalhos têm demonstrado a ação da dexametasona no músculo cardíaco. Tem sido visto que o uso crônico da dexametasona pode induzir a hipertrofia cardíaca, aumento na quantidade de colágeno no coração com uma dose de 0,5 mg/kg/dia (DE VRIES et al., 2002) e redução de VEGF com uma dosagem de 1 mg/kg/dia (BAREL et al., 2010). Todos estes efeitos podem comprometer a função da musculatura cardíaca. Por outro lado, o exercício físico pode ser visto como uma poderosa estratégia no combate a estes efeitos colaterais, pois aumenta o fator angiogênico (VEGF) tanto no músculo esquelético (OLFERT et al., 2001; AMARAL et al., 2001) quanto no coração (LLOYD et al., 2001), além de diminuir o colágeno e aumentar o número de vasos (AMARAL et al., 2000 e MELO et al., 2003). No entanto, QUINDRY et al. (2010) mostraram que o treinamento realizado com ratos por um período de 3 dias não era capaz de aumentar os níveis da proteína COX-2 no músculo cardíaco. Na verdade, alguns outros autores têm demonstrado que o VEGF atua como um fator desencadeante do crescimento de novos vasos, mas que após uma semana de exercício físico os níveis basais voltam ao normal, permanecendo alta a quantidade de vasos (AMARAL et al., 2008., GUSTAFSSON et al., 2002). Portanto espera-se que, após um período de treinamento físico, os níveis de VEGF estejam em nível basal, demonstrando uma prevenção induzida pelo treinamento aeróbio nos animais tratados.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Atualmente, é cada vez maior o número de pessoas que necessitam fazer uso de glicocorticóides sintéticos, seja no combate a processos inflamatórios, antialérgicos ou doenças autoimunes. Contudo, a literatura nos mostra que o uso crônico dos glicocorticóides sintéticos leva o paciente a diversos efeitos colaterais, afetando o metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, o que facilita o desenvolvimento de doenças como hipertensão, dislipidemia, síndrome metabólica e diabetes. Além destes efeitos, demonstramos recentemente que a dexametasona reduz significativamente a expressão do VEGF em diversos tecidos inclusive no músculo cardíaco. No entanto, os efeitos da dexametasona na musculatura cardíaca não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se, por outro lado, que o exercício físico determina vários ajustes do organismo, muitos deles opostos aos efeitos colaterais da dexametasona. Portanto, o objetivo do presente trabalho será verificar se o exercício físico tem a capacidade de prevenir e/ou atenuar a redução da expressão de VEGF na musculatura cardíaca determinada pelo uso crônico de glicocorticoide sintético. Além disso, este trabalho tem como objetivo verificar se esta redução de VEGF tem envolvimento da COX-2.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 40 ratos (Wistar) de 7-8 semanas de idade (200-250g, jovens), provenientes do Biotério da UNESP no Campus de Botucatu. Durante todo o protocolo, os animais foram mantidos em gaiolas com até cinco animais, no biotério da Faculdade de Ciências do campus da UNESP de Bauru, com ciclo claro escuro de 12:12 horas e temperatura controlada (22°C). Ração e água foram fornecidas *at libitum*. Os ratos foram pesados semanalmente durante o protocolo de treinamento físico e diariamente durante o tratamento com dexametasona (Balança Acrimet).

3.1 Avaliação da capacidade física máxima dos animais

A capacidade máxima foi avaliada de forma indireta por meio de teste de esforço máximo (TEM) em esteira ergométrica. Após um período inicial de adaptação à esteira (10 dias), os ratos foram selecionados segundo sua habilidade em andar/correr na esteira ergométrica, confeccionada especialmente para ratos (10 raias suspensas de acrílico, Inbramed, Millennium). Após esta pré-seleção, eles realizaram teste de esforço máximo (TEM-1), utilizando protocolo escalonado previamente validado e publicado por Silva et al. (1997), com incrementos de 5 m/min a cada 3 min. A carga máxima foi determinada quando o animal não conseguia correr espontaneamente. Este teste máximo foi realizado novamente após 4 e 8 semanas (TEM-2 e TEM-3, para readequar a carga, mantendo a intensidade de treinamento e para verificar o efeito do treinamento após as 8 semanas, respectivamente). Após o tratamento com dexametasona (10 dias) foi realizado mais um teste máximo (TEM-4) para verificar se a droga teve algum efeito sobre a capacidade física dos animais. Os ratos sedentários realizaram os testes de capacidade máxima no mesmo período em que os treinados e permaneceram sedentários durante o período de treino.

3.2 Grupos experimentais

Após a avaliação da capacidade física, os ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, seguindo protocolo de 70 dias.

Grupo 1: 10 animais que permaneceram sedentários durante todo o período e não receberam tratamento com dexametasona (SC).

Grupo 2: 10 animais que permaneceram sedentários por todo o período e receberam tratamento com dexametasona nos últimos 10 dias (0,5 mg/kg/dia, via-intraperitoneal) – (SD).

Grupo 3: 10 animais que foram submetidos a um protocolo de treinamento físico por 8 semanas e não receberam tratamento com dexametasona (TC).

Grupo 4: 10 animais que foram submetidos a protocolo de treinamento físico por 8 semanas seguido de tratamento com dexametasona por 10 dias (0,5 mg/kg/dia, via-intraperitoneal) – (TD). Os animais deste grupo continuaram a treinar durante o período de tratamento medicamentoso.

Os animais sedentários foram readaptados à esteira a cada 15 dias para a realização dos testes de esforço máximos e os animais não tratados receberam placebo (solução salina) pelo mesmo período de tratamento.

3.3 Protocolo de treinamento físico

O treinamento físico foi realizado em esteira ergométrica, cinco vezes por semana, durante uma hora por dia, por 8 semanas, com intensidade de 60% da velocidade máxima atingida no teste de esforço. A velocidade e o tempo de treinamento foram aumentados gradativamente a cada dia, sendo que na segunda semana de treino os animais já estavam realizando o treino na intensidade desejada. Depois de 4 semanas de treinamento foi aplicado um novo TEM para readequação da carga de treino (TEM-2). Ao término dos 60 dias de protocolo experimental, foi aplicado um novo teste de esforço máximo (TEM-3) para se avaliar o efeito do treinamento físico antes do início do tratamento com a droga. Os ratos sedentários realizaram os testes de capacidade máxima no mesmo período em que os treinados e permaneceram sedentários durante o período de treino.

3.4 Protocolo de tratamento e medida de glicemia

O protocolo pode ser melhor visualizado na linha temporal proposta para todo o protocolo experimental. Durante os últimos 10 dias do protocolo experimental, os ratos receberam tratamento farmacológico com dexametasona (Decadron®, 0,5 mg/kg/dia, *i.p.*). Os ratos controles foram tratados com salina.

Após 10 horas de jejum e após 24 horas da última sessão de exercício, foi avaliada a glicemia de jejum dos ratos por meio de uma gota de sangue extraída da cauda do animal e analisada por glicosímetro (One Touch Ultra, Johnsons&Johnsons®). Esta avaliação foi realizada no início e final do período de treinamento físico e antes e após o tratamento farmacológico.

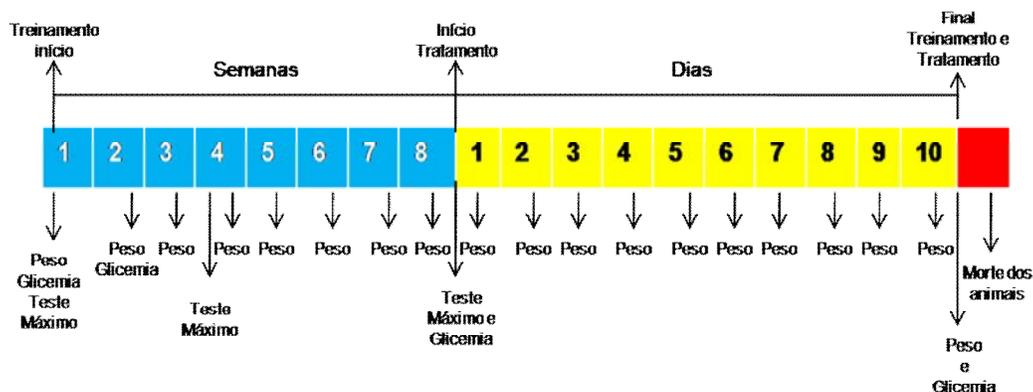


Figura 2. Linha do tempo do protocolo experimental.

3.5 Retirada do Coração

Após os protocolos experimentais, os animais foram eutanasiados com excesso de anestésico ANASEDAN® (cloridrato de xilasina) e DOPALEN® (cloridrato de quetamina), VETBRANDS do Brasil (1:1, 1mg/kg de peso corporal). O coração foi removido, separado em ventrículo esquerdo e ventrículo direito e imediatamente pesados. Os tecidos foram homogeneizados, centrifugados e armazenados com solução de Laemily em freezer a -20°C para futuras análises de expressão protéica.

3.6 Protocolo de dosagem de proteína

A amostra do miocárdio foi homogeneizada com homogeneizador Polytron em solução RIPA concentrada 10x contendo: 0.5M Tris-HCl, pH 7.4, 1.5M NaCl, 2.5% ácido deoxicólico, 10% NP-40, 10mM EDTA e adicionado 1% de PMSF na hora de usar. As amostras foram centrifugadas a 10000g por 5 minutos, e em seguida o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo, que foi armazenados em freezer a -20°C para futuras análises de expressão protéica. Os tecidos não homogeneizados foram armazenados em freezer -80°C.

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford utilizando um kit comercial (Bio-Rad Kit, Hercules, CA) com albumina como padrão, como previamente publicado (AMARAL et al, 2001). As amostras foram estocadas a -20°C até serem utilizadas para os experimentos de Western Blotting.

3.7 Procedimentos de Western Blotting

As proteínas foram eletroforéticamente separadas por tamanho, usando-se sistema de gel de poliacrilamida conforme publicação prévia do laboratório (AMARAL et al, 2001). Basicamente, foi utilizado gel com duas camadas de poliacrilamida, em diferentes concentrações: 5% na camada superior e 8% (COX-2) e 12% (VEGF) na camada inferior. A solução tampão consistiu de: 190 mM de glicina, 25 mM de Tris, 0,1% de SDS, pH 8,3. As amostras foram colocadas para correr com voltagem a 200 V por 50 minutos (ou até a completa separação das bandas). Marcadores de peso molecular foram simultaneamente utilizados como tamanho padrão. As proteínas foram transferidas eletroforéticamente para membrana de nitrocelulose com aplicação de corrente de 120 V por 1 hora e trinta minutos em tampão que consistiu de: 190 mM de glicina, 25 mM de Tris, 20% de metanol, pH 8,3. Logo após a transferência, as membranas foram lavadas em solução basal, bloqueadas em solução a 5% de leite sem gordura em solução basal por 2 horas e incubadas por toda a noite, a 4°C, com diluição apropriada do anticorpo anti-COX-2 (1:500, em albumina) e anticorpo monoclonal para sequências de VEGF (1:1000, em leite desnatado) humano. As membranas foram então lavadas e incubadas com um anticorpo secundário, IgG anti-rabbit e anti mouse (COX-2 e VEGF, respectivamente), por 1 hora e trinta minutos. O anticorpo foi detectado por

luminescência química aumentada (Super signal Pico) e as membranas foram expostas a filme de radiografia. As bandas foram analisadas utilizando um programa de computador (Scion Image, Comporation)

3.8 Métodos estatísticos

Todos os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Para todos os experimentos foi utilizada a análise de variância de dois caminhos (ANOVA), sendo um caminho o treinamento e outro caminho o tratamento farmacológico. Nas análises de comportamento de peso e capacidade máxima foi utilizada a análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com medidas repetidas, onde a repetição foram as semanas e dias. As amostras que apresentaram diferenças significativas foram analisadas pelo post-hoc de Tukey. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

A figura 2 A representa a evolução do peso corporal (PC) dos animais durante o protocolo experimental. Pode-se observar que no início do protocolo de treinamento os valores de PC eram semelhantes entre os grupos ($292 \pm 13\text{g}$; $301 \pm 11\text{g}$; $279 \pm 16\text{g}$; 305 ± 9 para SC, SD, TC e TD, respectivamente) e que, durante as oito semanas de treinamento, o PC apresentou evolução semelhante ($401 \pm 20\text{g}$; $412 \pm 15\text{g}$; $419 \pm 24\text{g}$; $383 \pm 18\text{g}$ para SC, SD, TC e TD, respectivamente antes do tratamento). Os 10 dias de tratamento com dexametasona, foram determinantes para a queda significativa do peso corporal dos animais a partir do quarto dia de tratamento (de $402 \pm 16\text{g}$ para $329 \pm 12\text{g}$ no grupo SD ao final do tratamento), resultando em uma queda de 18%. No grupo TD a queda foi semelhante (de $377 \pm 17\text{g}$ para $327 \pm 15\text{g}$ ao final do tratamento, 13%). Já os grupos controles não tiveram seus PCs alterados no mesmo período observado.

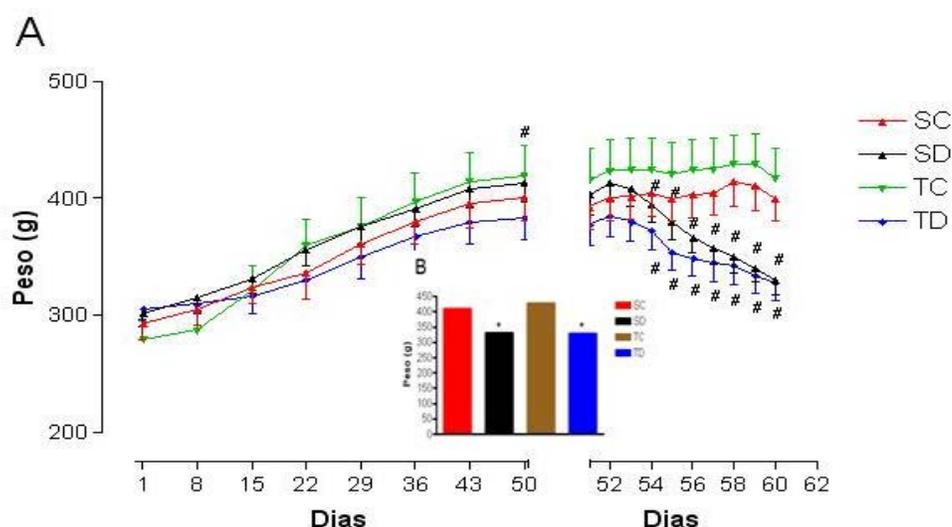


Figura 3 A: Comportamento do peso corporal durante as 8 semanas de treinamento físico (painel esquerdo) e no período de tratamento com dexametasona (10 dias, painel direito) e **Detalhe B:** Representa o peso corporal (g) no dia do sacrifício nos grupos sedentário controle (SC, n=9), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=8), treinado controle (TC, n=9) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=8). Significância: # vs início, * vs controle, $p < 0,05$.

A figura 3 demonstra os resultados dos quatro TEMs representados em minutos (min). Pode se observar que a capacidade dos grupos era semelhante no

início do protocolo ($10,84 \pm 1,03$; $9,77 \pm 0,75$; $10,21 \pm 1,32$; $9,87 \pm 0,97$ min para SC, SD, TC, TD, respectivamente). Depois de quatro semanas, o treinamento foi capaz de aumentar significativamente a capacidade física dos animais treinados ($12,58 \pm 0,62$; $14,09 \pm 0,57$ min para TC e TD, respectivamente $p < 0,05$) e no final do treinamento ($16,32 \pm 1,25$; $17,07 \pm 0,63$ min para TC e TD, respectivamente $p < 0,05$) o que resultou em um aumento 60% e 73% respectivamente. Os animais que permaneceram sedentários não tiveram alteração significativa em sua capacidade física. Os 10 dias de tratamento com dexametasona não interferiram no tempo de permanência na esteira dos animais sedentários (SD= $8,71 \pm 0,62$ vs $8,92 \pm 0,70$ min, para fim vs início, respectivamente $p < 0,05$) ou treinados (TD= $17,53 \pm 0,58$ vs $17,07 \pm 0,64$ para fim vs início, respectivamente $p < 0,05$) na esteira. Os animais que permaneceram sedentários durante o protocolo de treinamento não apresentaram melhora no tempo de corrida na esteira, conforme observado na figura 5.

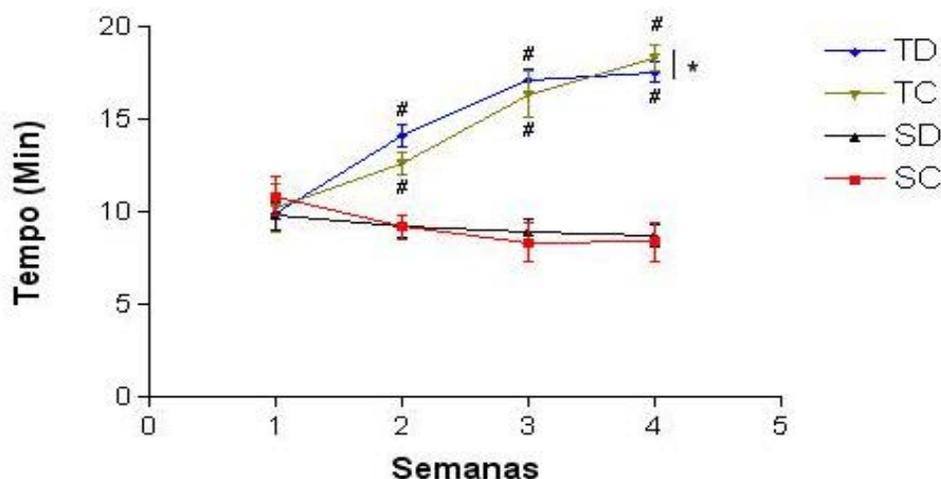


Figura 4: Capacidade física avaliada em minutos na esteira ergométrica nos testes máximos realizados durante o protocolo experimental. Avaliações 1,2,3 e 4 correspondem aos TEM-1, TEM-2, TEM-3 e TEM-4. Nos grupos sedentário controle (SC, n=10), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=10), treinado controle (TC, n=10) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=10). Significância: # vs início $p < 0,05$ * vs controle $p < 0,05$.

A figura 4 mostra a variação da distância percorrida pelos animais em metros, entre o 1º e o 3º TEM realizados com animais sedentários (de 111 ± 17 m

para 91 ± 16 m, do TEM-1 para TEM-3 respectivamente) e treinados (de 120 ± 27 m para 283 ± 27 m, do TEM-1 para TEM-3 respectivamente, $p < 0,05$).

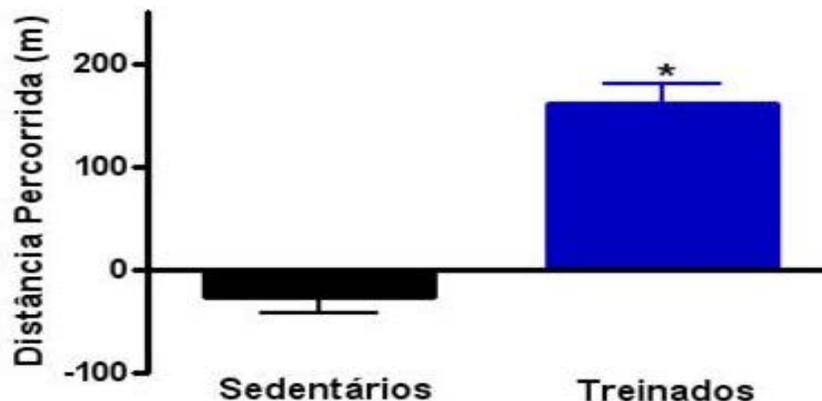


Figura 5: Variação da distância percorrida em metros entre a realização do terceiro teste máximo (TEM-3) e o primeiro teste máximo (TEM-1) nos grupos avaliados: treinados ($n=20$) e sedentários ($n=20$). Significância: * $p < 0,05$.

A figura 5 demonstra as avaliações da Glicemia de jejum durante o protocolo de treinamento e tratamento. No início do treinamento todos os grupos apresentam valores médios de glicemia de jejum parecidos ($93,40 \pm 1,07$; $90,80 \pm 2,12$; $89,20 \pm 2,74$; $77,50 \pm 2,84$ mg/dL, para SC, SD, TC e TD, respectivamente). Ao final do protocolo de treinamento os valores da glicemia em jejum permaneceram semelhantes entre os grupos ($90,10 \pm 2,00$; $85,80 \pm 1,86$; $85,77 \pm 1,80$; $83,40 \pm 1,69$ mg/dL, para SC, SD, TC e TD, respectivamente), mostrando que o treinamento sozinho não foi capaz para alterar os níveis de glicemia em animais com níveis glicêmicos considerados normais. Novas dosagens de glicemia foram realizadas após os 10 dias de tratamento com dexametasona, com o objetivo de verificar se a droga exerce alguma influência nos níveis glicêmicos. Foi verificado que, nos grupos controles (SC e TC), a glicemia de jejum não sofreu alteração significativa. Já dez dias de tratamento com Dexa promoveu aumento nos níveis de glicemia de jejum de 88% no grupo sedentário. Pode se observar que o treinamento aeróbio foi efetivo em atenuar o aumento da glicemia de jejum induzida pela Dexa. O aumento de 24% nos treinados foi significativamente menor que nos SC, como ilustrado na figura 3.

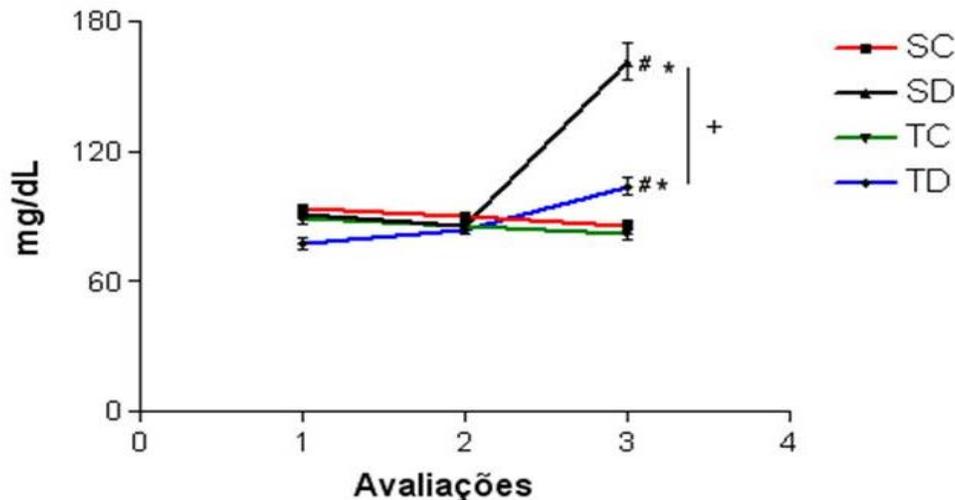


Figura 6: Valores de glicemia de jejum nas avaliações: 1-antes do treinamento; 2- antes tratamento e 3- após tratamento, nos diferentes grupos analisados: SC (n=10), SD (n=10), TC (n=10) e TD (n=10). Significância: # vs início do tratamento, * vs controle, + vs sedentário, $p < 0,05$.

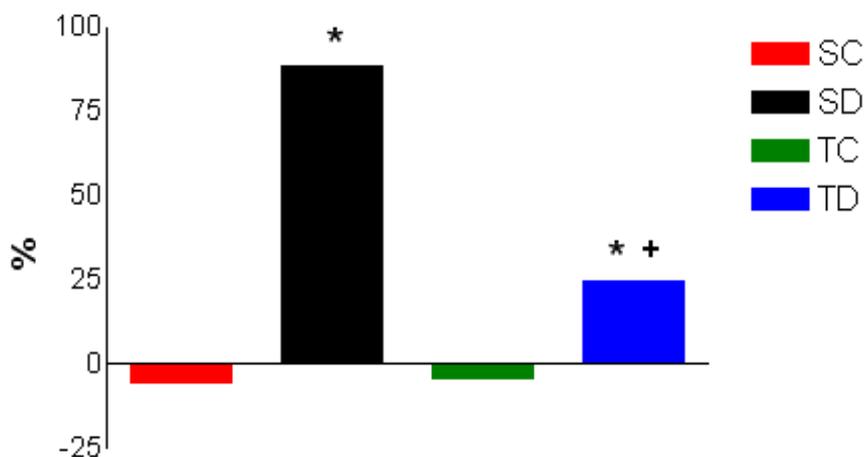


Figura 7: Percentual da variação da glicemia de jejum ao final do tratamento com dexametasona, nos diferentes grupos analisados: SC (n=10), SD (n=10), TC (n=9) e TD (n=10). Significância: * vs controle, + vs sedentário, $p < 0,05$.

Os pesos de peso corporal (PC), ventrículo esquerdo (VE), ventrículo direito (VD) e suas normalizações com PC e tamanho de tíbia estão representados na Tabela 1. Pode-se observar que o PC dos animais tratados com dexametasona tiveram uma queda significativa tanto nos animais sedentários, quanto nos treinados. Além disso, pesos de coração, VE e VD não foram alterados nem pela dexametasona nem pelo treinamento físico. Quando os valores do peso do coração

foram normalizados pelo peso corporal, foi observado um aumento na relação coração/PC, induzido pela dexametasona no grupo sedentário. No entanto, quando normalizados pelo tamanho da tibia, os valores de coração, VE e VD não apresentaram alterações induzidas tanto pela droga quanto pelo treinamento físico.

Tabela 1: Peso corporal, do coração, ventrículo esquerdo e direito nos diferentes grupos analisados.

	SC	SD	TC	TD
Peso corporal	415,11 ± 22,11	338,38 ± 18,18*	413,67 ± 26,65	337,80 ± 12,10*
Coração (g)	1,143 ± 0,058	1,169 ± 0,071	1,182 ± 0,064	1,079 ± 0,047
Coração / PC (mg/g)	2,760 ± 0,040	3,488 ± 0,216*	2,878 ± 0,081	3,204 ± 0,132
Coração / Tibia	280,29 ± 12,00	285,41 ± 15,82	291,90 ± 14,42	258,54 ± 10,29
VE (g)	0,786 ± 0,043	0,788 ± 0,038	0,849 ± 0,050	0,751 ± 0,035
VE / Tibia (mg/cm)	0,193 ± 0,009	0,192 ± 0,009	0,210 ± 0,012	0,180 ± 0,008
VD (g)	0,192 ± 0,014	0,219 ± 0,013	0,219 ± 0,011	0,216 ± 0,011
VD / Tibia (mg/cm)	0,047 ± 0,003	0,054 ± 0,003	0,054 ± 0,003	0,052 ± 0,003

VE, ventrículo esquerdo; VD ventrículo direito; PC, peso corporal. * vs controle, $p < 0,05$.

A figura 8 representa a expressão da proteína COX-2, analisada pela técnica de Western Blotting. Na parte superior da figura 8 está ilustrado um gel representativo da expressão protéica de COX-2 no músculo cardíaco nos diferentes grupos analisados. A análise quantitativa (Fig. 8 painel inferior) demonstrou que nem o tratamento, nem o treinamento exerceram qualquer alteração significativa sobre a expressão dessa proteína no miocárdio.

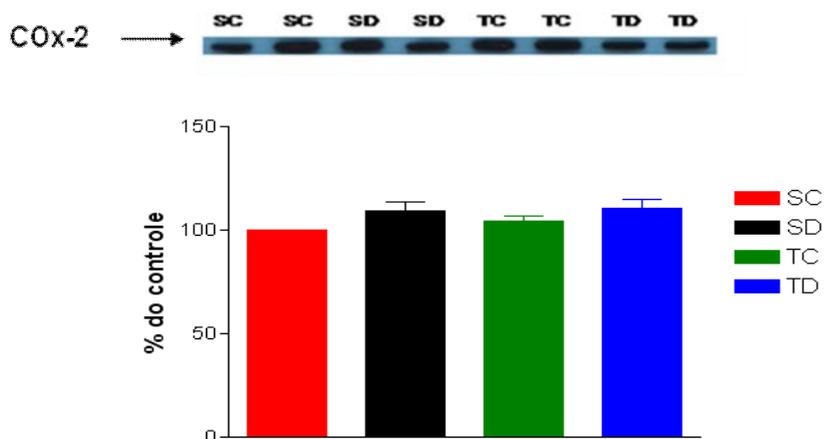


Figura 8: Painel superior. Gel representativo dos resultados de Western Blot para a proteína Ciclooxygenase 2 (COX-2) no músculo cardíaco. Painel inferior: Análise quantitativa da expressão da proteína COX-2 dos animais dos grupos sedentário controle (SC, n= 10), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=10), treinado controle (TC, n=10) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=10). Os valores representam a porcentagem em função do controle (SC).

A expressão da proteína VEGF analisada, está representada na figura 9. A parte superior ilustra um gel representativo com os resultados encontrados para a proteína VEGF no músculo cardíaco (VE). Com a análise dos resultados, podemos observar que, os animais sedentários tratados com dexametasona e os animais que somente tiveram a influência do treinamento, tiveram os níveis de VEGF elevados significativamente no músculo cardíaco.

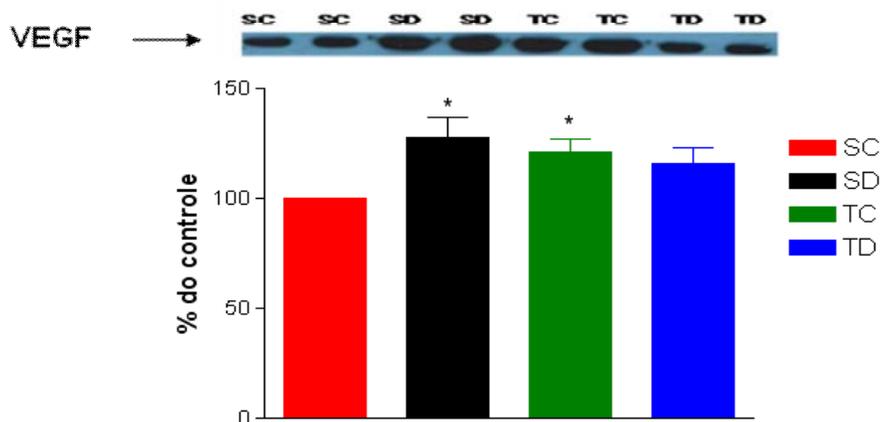


Figura 9: Painel superior. Gel representativo dos resultados de Western Blot para a proteína VEGF (VEGF) no músculo cardíaco. Painel inferior: Análise quantitativa da expressão da proteína VEGF dos animais dos grupos sedentário controle (SC, n= 10), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=10), treinado controle (TC, n=10) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=10). Significância :* vs controle, $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Os principais resultados do presente trabalho foram que o tratamento crônico com dexametasona, na dose de 0,5 mg/kg por dia, foi determinante para perda de peso corporal e aumento significativo nos níveis de glicemia de jejum. Além disso, determinou aumento nos níveis de VEGF no miocárdio dos animais sedentários sem determinar nenhuma alteração significativa nos níveis de COX-2, ou nas características morfométricas do coração. O treinamento físico aeróbio, de intensidade entre leve a moderada, realizado antes e durante o tratamento com dexametasona, foi eficaz em atenuar o aumento dos níveis glicêmicos dos animais tratados sem prevenir e/ou atenuar a perda de peso corporal. Além disso, o treinamento físico elevou significativamente os níveis de VEGF no músculo cardíaco sem determinar qualquer alteração na expressão protéica de COX-2 no miocárdio.

A dexametasona vem sendo amplamente utilizada atualmente pela sua eficácia nos tratamentos de processos inflamatórios e alérgicos. Porém, seu uso crônico promove diversos efeitos colaterais. Na verdade tem sido descrito que, com apenas uma dose única, Dexametasona é capaz de promover alterações no metabolismo glicolítico e de ácidos graxos livres em animais (QI et al., 2004) e humanos (SCHNEITER e TAPPY, 1998). O uso crônico dessa substância, por sua vez, determina diversos efeitos colaterais tais como, resistência periférica à insulina (SEVERINO et al., 2002; PAULI et al., 2006; RAFACHO et al., 2007; SANTOS et al., 2007; BAREL et al., 2010) acompanhada de hiperinsulinemia (SEVERINO et al., 2002; SANTOS et al., 2007; RAFACHO et al., 2007; DIONISIO et al., 2010) e hiperglicemia (SANTOS et al., 2007; BAREL et al., 2010; RAFACHO et al., 2007; DIONISIO et al., 2010; PINHEIRO et al., 2009; LOUZADA et al., 2009). Além disso, PINHEIRO et al. (2009) demonstraram aumento nos conteúdos plasmáticos de colesterol, lipoproteínas de baixa densidade, lipoproteínas de muito baixa densidade e triglicérides após tratamento com Dexametasona.

Estudos realizados anteriormente pelo nosso laboratório, com aplicações de Dexametasona a 1mg/kg por dia demonstraram resultados semelhantes ao encontrado na literatura. LOUZADA et al. (2009), DIONISIO et al. (2010) e BAREL et al. (2010) demonstraram que, ao final do protocolo de tratamento de 10 dias, os animais apresentaram quadro de hiperglicemia e hiperinsulinemia. Esta ação

hiperglicemiante dos glicocorticóides tem sido explicada pela estimulação da gliconeogênese e glicogenólise, associada à resistência periférica à insulina (SAAD, 1994). Uma possível explicação para a resistência à insulina em animais que foram tratados com dexametasona seria a disfunção endotelial, decorrente da diminuição na produção de óxido nítrico, via inibição da expressão da enzima óxido nítrico sintase (SEVERINO et al., 2002; MONDO et al., 2006). Além disso, LOUZADA et al. (2009) e DIONISIO et al. (2010) mostraram também, que ocorre diminuição nas proteínas envolvidas na captação periférica de glicose tanto dependente quanto independente de insulina.

BAREL et al. (2010) demonstraram que o tratamento com 1mg/kg por dia de dexametasona foi capaz de aumentar os níveis de glicemia de jejum em 136% nos animais sedentários, sendo que, os animais treinados tiveram aumento de 97%, representando atenuação significativa induzidas pelo treinamento físico. Os achados do presente estudo mostram que, com dosagem reduzida pela metade, os resultados são semelhantes aos encontrados, porém de menor magnitude, ou seja, animais sedentários tratados com 0,5 mg/kg por dia tiveram aumento nos níveis glicêmicos de 88% quando comparados ao grupo controle. Já os animais que foram tratados cronicamente com dexta e também realizaram o treinamento físico aeróbio (TD) mostraram menor aumento da glicemia (24%), deixando claro que o TF foi eficaz em atenuar o aumento dos índices glicêmicos em animais tratados com a droga.

Vários achados na literatura demonstram que o uso crônico de Dexta está intimamente ligado a perda de peso corporal (AHTIKOSKI et al., 2004; BAREL et al., 2010; DIONISIO et al., 2010; DE VRIES et al., 2002; PINHEIRO et al., 2009). Essa diminuição do PC devido a utilização de Dexta foi observada em diferentes dosagens, tanto baixa, como demonstrado por DE VRIES et al. (2002), Ma et al, (2003) e o presente trabalho, como alta, (LOUZADA et al, 2009, DIONÍSIO et al. 2009; BAREL et al. 2010). Por outro lado, utilizando uma dosagem bem mais baixa que o presente trabalho, apenas 2µg/kg por dia, Severino et al (2002) não encontraram redução significativa de peso corporal. Com estes achados podemos dizer que a queda de peso corporal pode estar intimamente ligada com a dosagem da droga aplicada. BAREL et al. (2010) demonstraram que o tratamento com dexametasona foi capaz de diminuir aproximadamente 20% do peso corporal do grupo SD durante os 10 dias de tratamento utilizando 1 mg/kg por dia. Os resultados

encontrados neste trabalho, usando 0,5 mg/kg por dia, mostraram uma queda no peso corporal de 18% no grupo SD. GILSON et al. (2007) por sua vez, demonstraram uma queda de apenas 5% em camundongos tratados com 0,6 mg/kg por dia. A diminuição do peso corporal pode estar associada à atrofia da musculatura esquelética, que ocorre principalmente em fibras brancas, as quais tem sido mais sensíveis aos efeitos da Dexa (AHTIKOSKI et al., 2004; GILSON et al. 2007; PINHEIRO et al., 2009; LOUZADA et al. 2009; DIONÍSIO et al. 2010; MARTUSCELI et al. 2010 e BAREL et al., 2010). Outra possibilidade para a perda de peso corporal é a diminuição da ingestão de alimentos nos animais tratados, que foi confirmada por SANTOS et al. (2007).

Um dos principais objetivos do presente estudo foi verificar a influência da dexametasona na expressão das proteínas Cicloxigenase-2 no miocárdio e se esta influência determinava alguma alteração sobre a expressão de VEGF. As Cicloxigenases (COXs) são enzimas responsáveis pelo catabolismo dos Ácidos Araquidônicos na biossíntese de prostaglandina (PG) e, posteriormente, em alguns substratos como prostaglandina E_2 (PGE_2), prostaciclina (PGI_2) e tromboxana (TXA_2). A PGE_2 por sua vez, tem participação na formação de VEGF, que é regulador da angiogênese tanto na musculatura esquelética, quanto na musculatura cardíaca. A atividade desta proteína (COX) e suas isoformas pode ser inibida pelo uso de drogas antiinflamatórias como a Dexametasona. Tem sido mostrado que, por atuar na via inflamatória, a dexametasona aumenta os níveis de lipocortina-1 e diminui a fosfolipase A (ANTI et al., 2008). Assim, o aumento da lipocortina diminui a expressão da Ciclooxygenase-2, inibindo a formação dos substratos que são derivados dos Ácidos Araquidônicos. Esta redução dos produtos do metabolismo do Ácido Araquidônico também é promovida pela redução da fosfolipase A. Neste sentido, a formação de Prostaglandina-2 (PGE_2) é menor, o que possivelmente explica parte da redução da expressão protéica do VEGF (BANDO et al., 2009 e BAREL et al., 2010). Estudos relacionando dexametasona e músculo cardíaco são escassos na literatura, dificultando assim a comparação dos resultados. DE VRIES et al. (2002) demonstraram que o uso crônico de glicocorticóides pode induzir hipertrofia cardíaca em camundongos neonatos, que foi normalizada após 2 meses. Estes achados concordam com os resultados de nosso laboratório (BAREL et al., 2010) e com o presente trabalho, pois animais com mais de 2 meses não tem hipertrofia cardíaca induzida pela Dexa. Em animais de 9 meses, houve aumento

dos níveis de colágeno no coração, dificultando assim o bom funcionamento do coração. SUN et al. (2008) demonstraram aumento da expressão de COX-2 no músculo cardíaco após a utilização de três glicocorticóides diferentes (hidrocortisona, corticosterona e dexametasona) em camundongos (20mg/kg por dia). A análise dos resultados encontrados no presente estudo mostrou que não houve alterações significativas nos níveis de COX-2 nos corações dos animais tratados. Uma possível explicação deste efeito diferente pode ser a dosagem da droga, que foi bem menor (0,5 mg/kg por dia) no presente estudo, comparado ao estudo de Sun et al. (2008). Alguns trabalhos demonstraram que a expressão de COX-2 estava reduzida em vários tecidos, como células epiteliais do pulmão (NEWTON et al., 1998), rim (ZHANG et al., 2003), musculatura lisa das vias aéreas (STWART et al., 1998) e fibroblastos cardíacos (SUN et al., 2008), sendo que um dos mecanismos propostos é a desestabilização do RNA mensageiro da COX-2 (LASA et al., 2001). No entanto, parece que este efeito não é observado em cardiomiócitos (SUN et al., 2008) concordando com os resultados do presente estudo. SUN et al. (2008) propuseram que os receptores de glicocorticóides no coração interagem com outros co-reguladores da expressão de COX-2 fazendo com que sua expressão seja tecido-específica. LIBBY et al (1973) já haviam demonstrado que o tratamento de curta duração com corticóide poderia reduzir a área infartada e agir como cardioprotetor. Mais estudos são necessários para se compreender os efeitos da Dexametasona na expressão da COX-2 no coração.

Uma das hipóteses do presente trabalho era que a dexametasona iria reduzir a expressão da COX-2 e conseqüentemente de VEGF, principalmente porque estudos realizados recentemente por nosso laboratório (BAREL et al., 2010) e (PEREZ et al., 2006) demonstraram que a expressão de VEGF estava diminuída no coração de animais que foram tratados com dexametasona em doses de 1 mg/kg por dia.

A literatura nos mostra que o tanto o cortisol, quanto os glicocorticóides sintéticos, são capazes de inibir a expressão de VEGF (NAUCK, 1998) tanto no músculo esquelético, quanto no coração (BAREL et al., 2010) porém, achados envolvendo a ação da Dexametasona nestes músculos são escassos na literatura. Sabe-se que a cicloxigenase-2 (COX-2) é a enzima responsável pela produção PGE2 e que a inibição da atividade da enzima COX-2 diminui significativamente a expressão de VEGF, que está diretamente relacionado com processos inflamatórios,

aumentando a permeabilidade vascular (PAI et al, 2001). Ao contrário do esperado, a expressão de VEGF aumentou 26%. Provavelmente este aumento de VEGF ocorreu por outra via independente de COX-2 e PGE₂. Sabe-se que a expressão de VEGF é dependente de Ang II (AMARAL et al., 2001) e que a Dexametasona aumenta as concentrações de Ang II e de seus receptores. Portanto, este pode ter sido o mecanismo responsável pelo aumento de VEGF observado no miocárdio dos animais tratados com Dexametasona. Mais estudos são necessários para verificar o efeito de diferentes dosagens de Dexametasona na expressão de VEGF no coração, uma vez que demonstramos anteriormente que 1 mg/kg por dia diminuía esta expressão.

Já é bem sabido que o exercício físico, praticado com intensidade leve a moderada, trás benefícios significativos para a saúde, sendo que alguns destes efeitos se opõem aos malefícios causados pelo tratamento crônico com dexametasona. Tem sido demonstrado que o exercício físico melhora os quadros de hiperglicemia e hiperinsulinemia (PAULI et al., 2005;; PINHEIRO et al., 2009; BAREL et al., 2010), promove melhor controle sobre o perfil lipídico (Pauli et al., 2005; PINHEIRO et al., 2009), controla os níveis pressóricos elevados (AMARAL et al., 2000, 2001) e aumenta a expressão de PGE₂ (LAMBERG et al., 2003) e VEGF (AMARAL et al., 2001), promovendo maior vasodilatação e angiogênese, tanto na musculatura esquelética (OLFERT et al., 2001; LLOYD et al., 2001, AMARAL et al., 2008) quanto na cardíaca (AMARAL et al., 2000, MELO et al., 2003, BAREL., 2010). Apesar dos efeitos benéficos causados pelo exercício físico estarem bem estabelecidos, quase nada se sabe sobre os esses efeitos preventivos do exercício físico frente aos efeitos colaterais da dexametasona. PAULI et al. (2006), PINHEIRO et al. (2009) e BAREL et al. (2010), demonstram que o treinamento aeróbio foi capaz de diminuir a resistência periférica à insulina e melhorou a captação de glicose pelo músculo. Além disso, o exercício diminuiu os depósitos de gorduras (PAULI et al., 2006) e melhorou o perfil lipídico, prevenindo o aparecimento de colesterol considerado ruim, LDL, VLDL e triglicérides (PINHEIRO et al., 2009).

QUINDRY et al. (2010) demonstraram que o treinamento físico, realizado por apenas 3 dias, não foi capaz de aumentar os níveis de COX-2 no coração de ratos, da mesma forma, BAI et al. (2009), constataram que o treinamento físico crônico não foi capaz de alterar os níveis de COX-2 no músculo cardíaco de ratos com Insuficiência Renal Crônica.

Por outro lado, Marini et al. (2007) observaram, que após 14 semanas de treinamento de baixa intensidade em esteira, houve um aumento significativo nos níveis de COX-2 no miocárdio. Diferente dos achados anteriores, os resultados do presente estudo não demonstraram aumentos significativos de COX-2. Mais estudos são necessários para investigar os mecanismos responsáveis pelos efeitos do exercício na expressão de COX-2 no miocárdio dos animais. Apesar da expressão da COX-2 não estar aumentada, a expressão de VEGF foi 21% maior nos corações dos ratos treinados em comparação com os sedentários. A literatura nos mostra que o exercício físico determina aumento significativo da expressão de VEGF em humanos (GUSTAFSSON et al., 2002) e animais com 3 dias de exercício, reduzindo seus valores após alguns dias (AMARAL et al, 2008). Concordando, BAREL et al. (2010) demonstraram que após 8 semanas de treinamento, a expressão de VEGF não estava aumentada. As razões que levaram ao aumento do VEGF ainda precisam ser esclarecidas. Portanto, o presente trabalho demonstrou que o tratamento crônico com a Dexa não altera a expressão de COX-2 no coração de ratos e aumenta VEGF. O treinamento físico aeróbio não teve efeito significativo na expressão destas proteínas em animais tratados com Dexa.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo nos permitem sugerir que o tratamento crônico com dexametasona eleva os níveis da glicemia de jejum e determina a redução de peso corporal dos animais, além disso, mostrou ser capaz de elevar a expressão de VEGF no músculo cardíaco sem determinar qualquer alteração na proteína COX-2. O treinamento físico, por sua vez, não foi eficaz em evitar a queda do peso corporal, porém, atenuou o aumento da glicemia de jejum nos animais tratados com dexametasona, além de elevar os níveis de VEGF no coração. Os efeitos ainda são controversos e sugerem que mais estudos são necessários para se compreender os efeitos da Dexametasona e do exercício na via dos ácidos araquidônicos no coração.

REFERÊNCIAS

AHTIKOSKI, A.M. et al. Regulation of type IV collagen gene expression and degradation in fast and slow muscles during dexamethasone treatment and exercise. **Eur J Physiol**, v. 448, n. 1 p. 123-130, 2004.

AMARAL, S.L, ZORN, T.M.T. and MICHELINI, L.C. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. **J hypertens**, v. 18, p. 1563-1572, 2000.

AMARAL, S.L, LINDERMAN, J.R, MORSE, M.M, GREENE, A.S. Angiogenesis induced by electrical stimulation is mediated by angiotensin II and VEGF. **Microcirculation**, v. 8, n.1, p. 57-67, 2001.

AMARAL, S.L. et al. Time course of training-induced microcirculatory changes and of VEGF expression in skeletal muscles of spontaneously hypertensive female rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 41, p. 424-431, 2008.

ANTI S.M.A.; GIORGI R.D.N.; CHAHADE W.H. Antiinflamatórios hormonais: Glicocorticóides. **Einstein**, 6 (Supli 1), S159-S65, 2008.

BAI, Y. et al. Effect of Exercise on Cardiac Tissue Oxidative and Inflammatory Mediators in Chronic Kidney Disease. **Am J Nephrol**. V.29 p. 213–221, 2009.

BANDO, Y. et al. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E₂ is involved in vascular endothelial growth factor production in interleukin-1 α -stimulated human periodontal ligament cells. **J Periodont Res**. v. 44, p. 395–401, 2009.

BAREL, M. et al. Exercise training prevents hyperinsulinemia, muscular glycogen loss and muscle atrophy induced by dexamethasone treatment. **Eur J Appl Physiol**, v.108, p.999-1007, 2010.

CARLILE, J. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues: possible relevance to angiogenesis, tumour progression and field cancerisation. **J Oral Pathol Med**, v.30, n.8, p. 449-457, 2001.

DE VRIES, W.B. et al. Alterations in adult rat heart after neonatal dexamethasone therapy. **Pediatr Res**, V. 52, N. 6, P. 900-6, 2002.

DIONISIO, T.J. et al. Papel preventivo do exercício físico nas alterações observadas na via de sinalização insulínica induzidas pela dexametasona. 2010. Dissertação de Mestrado (Fisiologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

FERRARA, N. et al.. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. **Endocr Rev**, v.13, p. 18-32,1992.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 237, p. 1-29, 1999.

GILSON, H. et al. Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. **Endocrinology**, v.148, n.1, p.452-460, 2007.

GUSTAFSSON, T. et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor in human skeletal muscle in response to short-term one-legged exercise training. **Pflugers Arch**, v. 444, p. 752-9, 2002.

HOUCK, K.A. et al. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. **J Biol Chem**, v. 267, n. 36, p. 26031-7, 1992.

HUDLICKA, O.; BROWN, M.D. Postnatal growth of the heart and its blood vessels. **J Vasc Res**. v.33, p. 266-287, 1996

LAMBERG, H. et al. Cyclo-oxygenase-2 mediated prostaglandin release regulates blood flow in connective tissue during mechanical loading in humans. **J Physiol**, 551.2, pp.683–68, 2003.

LASA, M. et al. Dexamethasone destabilizes cyclooxygenase 2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38. **Mol Cell Biol**. v. 21, p.771–80, 2001.

LIBBY, P. et al. Reduction of experimental myocardial infarct size by corticosteroid administration. **J Clin Invest**. v. 52, p.599–607, 1973.

LLOYD, P.G. et al. Arteriogenesis and angiogenesis in rat ischemic hindlimb: role of nitric oxide. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 281, p. H2528-H2538, 2001.

LOUZADA, J.C.A.; VISCELLI, B.A.; DIONISIO, T.J.; DIONISIO, E. J.; MARTUSCELLI, A. M.; AMARAL, S. L. Exercício Físico atenua redução da proteína CaMK II induzida pela Dexametasona. In: **17º Simpósio Internacional De Iniciação Científica SIICUSP (resumo)**, 2009.

MA, K. et al. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.285, n.2, p. E363-71, 2003.

MARINI, M. et al. Mild exercise training. Cardioprotection and stress genes profile. **Eur J Appl Physiol**. v.99, p. 503-510, 2007.

MARTUSCELLI, A. M. Efeitos Preventivos do Exercício Físico na Expressão de Proteínas Envolvidas na Atrofia Muscular em Ratos Tratados com Dexametasona. In: **FAPESP (resumo)**, 2010.

MELO, R.N.; MARTINHO, E.JR.; MICHELINI, L.C. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: Wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. **Hypertension**. v. 42, p.851-857, 2003.

MONDO, C.K. et al. Anti-oxidant effects of atorvastatin in dexamethasone-induced hypertension in the rat. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 33, n. 11, p. 1029-1034, 2006.

NEWTON, R et al. Repression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 release by dexamethasone occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms involving loss of polyadenylated mRNA. **J Biol Chem**, v.273, n.48, p. 32312-32321, 1998.

OLFERT, I.M. et al. Skeletal muscle capillarity and angiogenic mRNA levels after exercise training in normoxia and chronic hypoxia. **J Appl Physiol**, v.91, n.3, p.1176-84, 2001.

OTANI, A. et al. Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced angiogenic activity in retinal microcapillary endothelial cells. **Circ Res**, v.82, p. 619-628, 1998.

PAULI, J.R, GOMES, R.J, LUCIANO, E. Eje hipotálamo-pituitario: efectos del entrenamiento físico em ratas Wistar com administración de dexametasona. **Rev Neurol**, v.42, n.6, p. 325 – 331, 2006.

PARK, J.E.; KELLER, G.A.; FERRARA, N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. **Mol Biol Cell**, v.4, n.12, p.1317-26, 1993.

PEREZ, O.A. et al. Efeitos preventivos do exercício físico aeróbico na musculatura esquelética e cardíaca de animais tratados com dexametasona. 2006. Monografia – Universidade Estadual Paulista, Bauru, SP.

PINHEIRO, C.H. et al. Exercise prevents cardiometabolic alterations induced by chronic use of glucocorticoids. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, p. 372-380, 2009.

POLVERINI, P.J. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. **J Dent Educ**, v.66, n.8, p. 962-75, 2002.

QI, D. et al. Single-Dose Dexamethasone Induces Whole-Body Insulin Resistance and Alters Both Cardiac Fatty Acid and Carbohydrate Metabolism. **Diabetes**, v.53, p. 1790-1797, 2004.

QUINDRY, J.C. et al. Exercise does not increase cyclooxygenase-2 myocardial levels in young or senescent hearts. **J Physio Sci**, 60(3): p. 181–186, 2010.

RAFACHO, A. et al. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. **Can J Physiol Pharmacol**, v.85, p.536-45, 2007.

RICHARDSON, R.S. et al. Exercise adaptations attenuates VEGF gene expression in human skeletal muscle. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.279, p. H772 – H778, 2000.

SAAD, M.J.A. Molecular mechanisms of insulin resistance. **Braz J Med Biol Res**,

v.27, p. 941 – 57, 1994.

SANTOS, C.L.; RAFACHO, A.; BOSQUEIRO, J.R. Efeitos da administração de dexametasona in vivo sobre glicemia, insulinemia e substratos circulantes são dependentes do tempo de tratamento. **Biosci J**, v.23, p.101-110, 2007.

SEVERINO, C. et al. Low-dose dexamethasone in the rat: a model to study insulin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.283, n.2, p. E367-73, 2002.

SCHNEITER, P.; TAPPY, L. Kinetics of dexamethasone-induced alterations of glucose metabolism in healthy humans. **Am J Physiol**, v.275, n.5 Pt 1, p. E806-13, 1998.

SHIMPO, H. et al. Regulation of prostaglandin E(2) synthesis in cells derived from chondrocytes of patients with osteoarthritis. **Orthop Sci**, v.14(5), p. 611-7, 2009.

SUN, H. et al. Corticosteroids induce COX-2 expression in cardiomyocytes: role of glucocorticoid receptor and C/EBP- β . **Am J Physiol Cell Physiol**, v.295, p. 915-922, 2008.

STUART J. HIRST e TAK H. LEE. Airway Smooth Muscle as a Target of Glucocorticoid Action in the Treatment of Asthma. **Am J Respir Crit Care Med**. v.158, p. S201–S206, 1998.

VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**. v. 38, p. 97-120, 1998.

ZACHARY, I. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.280, n.6, p. C1375-86, 2001.

ZHANG, M.Z. et al. Regulation of renal cortical cyclooxygenase-2 in young rats. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.285, n. 6, p. F881–F888, 2003.

Aluno: _____

Thiago Trevisolli Lourenço

Orientadora: _____

Sandra Lia do Amaral Cardoso