

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
Departamento de Educação Física

**EFEITOS PREVENTIVOS DO TREINAMENTO FÍSICO NA
EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS COX-2 E VEGF DE RATOS TRATADOS
COM DEXAMETASONA**

Evandro José Dionísio

Bauru

2011

Evandro José Dionísio

**EFEITOS PREVENTIVOS DO TREINAMENTO FÍSICO NA
EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS COX-2 E VEGF DE 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: Prof^a Dr^a Sandra Lia do Amaral

Bauru – 2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu irmão e aos meus avós, os quais sempre estiveram preocupados com minha formação profissional. Certamente sem essa família maravilhosa eu não teria nada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo o que ELE fez e vem fazendo em minha vida. Inicialmente pela minha família e minha saúde, mas também pelas inúmeras graças alcançadas nos últimos anos. Profissionalmente, agradeço pela minha entrada na Universidade Estadual Paulista em 2007 e minha entrada na Universidade de São Paulo (FOB/USP) no meio deste ano. Agradeço também pela minha linda namorada, a qual foi crucial nesse último ano, sempre me dando ânimo e força para suportar essa nova fase da minha vida.

Agora gostaria de agradecer as pessoas que participaram efetivamente da minha formação e deixaram um pedacinho delas comigo. Vamos por ordem cronológica para tentar não esquecer de ninguém.

2007 – Primeiro ano de faculdade.

Sandra Lia do Amaral ou para mim, San.

Me acolheu logo na primeira semana de aula e estendeu os braços (que parecem pequenos, mas são gigantes) para me conduzir por toda minha graduação. Me orientou em 2 projetos durante todo o curso (ou quase todo) e sempre teve a paciência de me ensinar as coisas da faculdade e da vida. Posso dizer sem medo de errar que foi uma segunda mãe. Me emociono só de pensar o quanto Deus foi bom em tê-la colocado em meu caminho.

San, já agradeço, mas não me canso de fazer, pois minha faculdade se resume em você querida. Obrigado de coração por todos os ensinamentos, mas não pense que acabaram não, pois ainda há “muita lenha para queimar”. Peço desculpas, porque sei que te magoei algumas vezes, mas penso que isso é normal, pois comumente acontece entre pais e filhos. Mesmo assim, tenho a certeza de que prevalecerá nossa união, amizade e lembranças de um tempo que só a gente sabe o quanto foi bom.

Mais uma vez obrigado, obrigado e obrigado, e saiba que já estou morrendo de saudades.

Rafael Martins Andrade – Véio – Coxtax Largax – Micareteiro Pegadô

Meu orientador na primeira pesquisa que participei da faculdade. Como tinha 17 anos ainda, iam de busão para os infinitos postos de saúde da cidade “Sem Limites” (só quando tivemos que entrar em todas as bicoas da cidade, que eu entendi esse apelido). Faltando alguns postos de saúde para irmos ainda, fiz 18 anos e ganhei uma moto e quase fomos atropelados por um caminhão no meu primeiro dia de piloto.

Fora isso, gostaria de dizer que sinto saudades parceiro. Não se faz mais unespianos como antigamente por aqui.

Marco Betti / Gui Cabeçone / Rosana “Bom dia” / Tchururu / Camilinha

Muito obrigado pelas manhãs de terça, quarta e sexta. Infinitas risadas que eu ainda dou só de lembrar. Todos vocês fazem parte dessa monografia, foi o melhor primeiro ano de faculdade que alguém poderia ter. =)

Brunão

Meu bixão de laboratório! Hehehe. Entrou na Unesp em 2007 e já foi automaticamente escalado para o LEFEx. Hoje em dia, ele finge que trabalha em outros laboratórios também.

Valeu gordinho, quebrou vários e vários galhos e foi um dos maiores companheiros de toda minha graduação. Além disso, nunca mediu esforços pra me ajudar. Muito obrigado mano, por tudo. Sempre que precisar, estarei aqui pronto para retribuir tudo o que fez por mim.

LAPEANOS e LEFExeanos

Finha, Ricão, Richarlyson (tenho trauma até hoje por ter pego seu tenis no trote), Leticia, Orlindo, Thiago Trevisolo, também agradeço de coração, pois foram meus primeiros “alunos”, pois como eu estava há mais tempo nos projetos, pude passar todos os ensinamentos que havia aprendido com meus veteranos. Torço muito pelo sucesso de cada um de vocês.

ESPECIAIS

Matheus Barel

Meu maior professor nessa faculdade. Me ensinou tudo o que um pai deve ensinar para seu filho. Estudar e pegar muié (desculpa, mas tenho que falar). Hehehe. Não tenho palavras para agradecer toda sua dedicação, paciência, companheirismo, etc. Te amo muleque!

Juliana Louzada (Irmãzinha)

Sinto muito sua falta Ju, muito mesmo. Vários anos de convívio diário me fez admirá-la cada dia mais. Guerreira, carinhosa, amiga, parceira, solidária, etc. Na verdade você tem todas as qualidades possíveis para um ser humano. MUITÍSSIMO obrigado por tudo Ju. Caronas, conselhos, risadas quando ngm ria (exemplo “tum tá”). Hehehe. Te amo muitooooooooo mana, sempre que precisar...moro pertinho. Aaa, agradece sua linda família e o Diegão também, pois todos a sua volta são muito especiais.

Galera da minha sala 1: Batata, Imperatozi, Ariel e Serginho

Valeu pela risada e pelo fut mulecada. Sem vocês ia ser duro aguentar 5 anos de faculdade. Deixarão muitas saudades. Especialmente o Tozi e o Ariel, que conviveram comigo no projeto também. Parceiros pra vida toda....

Espero que o churrasco que não fizemos na graduação saia quando tivermos formados, por favor!!! Hehe

Galera da minha sala 2: Bia e Deza

Obrigado por tudo queridas. Já agradei e me declarei em um dos meus aniversários e direi novamente. Amo vocês!! Por tudo o que fizeram e ainda fazem por mim. Por serem meus primeiros amigos da faculdade. Por me tratarem com imenso carinho durante todo esse tempo. Valeu memo negas veias.

Linokita

Obrigado de coração por todo o amor que dedica a mim. Sei que por vezes não correspondo a altura, mas saiba que você é uma irmã pra mim. Certamente é a irmã que eu nunca tive. Digo isso, pois nossas brigas, rizadas, bebedeiras, conversas, foram as melhores.

De todas as amizades com pessoas do sexo feminino, certamente foi a mais intensa e verdadeira, a qual durará para sempre.

Muito obrigado mesmo pelos presentes, pelas hospedagens, pelas quebradas de galho, por TUDO querida. TE AMO ABSURDAMENTE e sempre que precisar, você terá um maninho magrelo aqui em Bauru pronto pra te socorrer.

Desejo toda a felicidade do mundo pra você. Que você passe no mestrado e case com o Renatão, pois você é muito iluminada e merece tudo o que deseja.

Agradeça a sua família também, TODOS eles, pois sempre me trataram com muito carinho e atenção. Estou devendo uma visita!!!

Fabio Feio, ops Fera

Simplismente o melhor amigo da faculdade, quiçá da vida. Te amo muleque. Nem preciso falar o quanto foi 10 veiz nossa facul. Obrigado por tudo.

Agradeça sua família também por todo o carinho.

Saudades irmão, sucesso!

Necessitamos de uma nova reunião alcoólica, pois depois que voltei a beber não nos vimos mais. Abraço nego.

Xella, Mazotti, Bah, Karen

Amigos eternos e fiéis, os quais de alguma forma contribuíram para minha entrada e saída da faculdade.

Por ordem cronológica, primeiro a Mazotti. Sempre me perseguiu, por toda minha vida escolar. Te amo querida. Obrigado por todos esses anos (já perdi a conta).

Karen – Muitos anos de amizade também, a qual se intensificou nos ultimos anos e é essencial pra mim. Te amo preta. Obrigado por toda demonstração de amor e afeto.

Muitas baladas e muita parceria nesses ultimos anos, sinto saudades!!!

Bah – Muitíssimo obrigado pelas hospedagens, pois foi nessas idas a Arealva que nossa amizade se fortaleceu. Carrego você aqui comigo querida, você e sua família. Estou com saudades, faltou você na nossa ultima reuniãozinha.

Xella – Desde o princípio amizade forte, verdadeira, que trinca até o final. Te amo nego, obrigado mesmo por tudo.

Eto'o e Berto

O que a bola uniu nada no mundo destrói. Espero não perder o contato de vocês, pois vão fazer falta. O dia em que eu quiser ter uma conversa nerd, eu chamo vocês e o dia em que eu quiser tomar umas e dar risada, também chamo vocês. Mas posso ser sincero agora? Pra mim os 2 são fracos de lata!!! Aioaeiuioaueuaei, zueira interminável.

Caião, Rica, Rob's Lov's

Irmãos que eu amo. Muito obrigado por tudo: fut, risadas, praias, companheirismo, amizade, carinho. Amigos para a vida toda. Me ajudaram durante esses 5 anos, principalmente com as viagens e os churrascos nos finais de semanas.

Jãozin cabeça, Xiuxa, Padrinho e Lady Ana

Muito obrigado por tudo. É a melhor família que Deus poderia ter colocado em meu caminho. O amor que sinto por vocês é muito maior que qualquer tipo sanguíneo. Vocês formam a família que escolhi!

Calabrinha meu lindo

Melhor primo do mundo. Ainda mais por ter dado cabeçada na facul antes de mim e me ensinado o caminho da glória. Além de ter sido um parceiro durante a vida toda, facilitou meu entrosamento com a galera. Te amo primo, se é 10 ano.

Paulão Cavallo, Tia linda e Mayara Restart

Nem preciso dizer o quanto amo vocês neh? O pessoal da faculdade são meus amigos hoje, só para poderem frequentar a casa de vocês no final de semana. É a única casa de Bauru que não falta uma breja gelada e uma mesa farta. Obrigado de coração por todo o carinho que me dão. Sinto como se vocês fossem meus pais e irmã. Sem vocês eu não teria como voltar das baladas da facul bebado. Amo incondicionalmente!!!

Pai e Mãe

Me emociono só de pensar em escrever para vocês. Esperem um pouco, deixe eu respirar.....pronto!

Muito obrigado pela minha vida! Deus tem sido muito bom comigo desde o dia em que me colocou na barriguinha da Silveta. São os melhores pais que eu poderia ter.

Ainda estou chorando, esperem mais um pouco.....pronto!

Desde pequenininho, sempre me deram a liberdade que eu precisava, sempre confiaram em mim. Nunca deixaram de me cobrar e, certamente, é esse o maior motivo de eu estar me formando em uma faculdade pública já empregado em outra faculdade pública. Sei que eu dei muito mais dor de cabeça para vocês do que o Thi, mas esse é o meu jeito, o que posso fazer? Mesmo assim, sempre fui exemplo fora de casa, tanto na escola, quanto na casa de amigos, na faculdade e agora no meu emprego. Tudo isso graças ao excelente exemplo que tenho em casa e à excelente educação que me deram. Me espelho muito em vocês para constituir a minha família. Se eu puder dar metade do que recebi para meu filho, estarei com a consciência tranquila.

Amo vocês, vocês são tudo para mim!!! Meu maior sonho é retribuir tudo o que me deram.

Obrigadooooooooo de coração! E sintam-se orgulhosos pela família que criaram.

Thi (manão)

Agora eu choro de vez!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

A pessoa que eu mais amo na vida. Meu pai, meu companheiro, meu irmão, meu melhor amigo, meu tudo! (muito choro)

Muito obrigado brother, por TUDO! Principalmente depois dos seus 18 anos, idade em que parou de me surrar.

Obrigado pelas conversas, pelos dim dim, pelas risadas, pelo amor demonstrado e, principalmente, pelos conselhos. Não sei se mereço tudo o que conquistei até hoje, mas merecendo ou não, 95% foi graças a você. Desde o terceiro colegial, tudo o que conquistei é mérito seu e, por mais que eu me esforce e faça o possível, jamais conseguirei retribuir. Quem dera se todas as pessoas tivessem um irmão mais velho assim. Espero na próxima encarnação ser o irmão mais velho, para então poder retribuir.

Te amo te amo te amo mano. Obrigado mais uma vez....

MILISC (Miliane Sem Cabeça)

Cunhada mais linda e parceira do mundo. Presenciou metade da minha vida e toda a minha faculdade. Desde sempre transformando meu irmão em uma pessoa melhor. Por isso, agradeço do fundo do coração por tudo, e saiba que também será madrinha do meu casamento. Hehehe.

61 C

Obrigado meninas por todo o carinho. Me receberam muito bem e ainda convivem diariamente com o magrelo aqui. Assim como a Ana, vocês foram peças fundamentais nesse último ano, sempre me divertindo e animando. Sei que posso contar com vocês pra tomar uma, falar mal dos outros ou até mesmo falar de coisas sérias. Adoro vocês. LINDAAAAAAAAS. heheh

Aninha, Xonada Véia, Xonada, Querida, Processo de namorada, Namorada, Amor

Linda, como você ousa dizer que não representou nada em minha faculdade? Você representou(a) muito!!!! No momento em que mais precisei, o mais difícil de toda minha graduação, quem Deus colocou em meu caminho? A menina que tinha todas as características de que eu temia, mas que mesmo assim me conquistou. A menina/mulher que eu sinto um orgulho enorme por suas infinitas qualidades.

Muito obrigado amor, por sempre me escutar, dar conselhos, broncas, pelas nossas conversas, bebedeiras, por todo seu amor. Certamente, eu teria sofrido muito mais nesse último ano se não fosse por você. Me trouxe sorte, paz, tranquilidade, AMOR, felicidade, ou seja, tudo o que precisava.

Você ainda me ajuda diariamente, pois só você sabe o quanto a adaptação a essa nova fase da minha vida está sendo difícil.

Muito obrigado amor! Te amooooo muito, muito, muito.

E pode esquecer de ir embora de Bauru!!!!!!!!!!!!!!

Sogra, Sogra e cunhado, tive uma ótima impressão de vocês...espero formar uma linda família Dionísio/Apolônio.

FIM

Sinto-me honrado por ter 8 folhas de agradecimentos. Talvez seja o record dessa universidade! Isso significa que sou uma pessoa muito abençoada!!!

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso corporal e muscular dos animais no final do protocolo experimental. Significância: + vs grupo controle, $p < 0,05$	29
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Linha do tempo do protocolo experimental. 25
- Figura 2:** Evolução do peso dos ratos durante as 8 semanas de treino (parte esquerda do gráfico) e os 10 dias de tratamento com o fármaco (parte direita do gráfico). Significância: * VS início, $p < 0,05$ 28
- Figura 3.** Δ da distância percorrida (em metros) pelos ratos sedentários ($n=20$) e treinados ($n=20$) no 1º e 3º testes máximos. Significância: # VS. sedentário, $p < 0,05$ 29
- Figura 4:** Valores de Glicemia de jejum antes e após o treinamento (1ª e 2ª avaliações, respectivamente) e após o tratamento com 0,5 mg/kg/dia – *i.p.* (3ª avaliação) nos grupos experimentais. Significância: # VS. sedentário, + VS. Grupo controle $p < 0,05$ 30
- Figura 5a:** Análise quantitativa da expressão da proteína COX-2 dos grupos sedentário controle (SC, $n=4$), sedentário tratado com dexametasona (SD, $n=4$), treinado controle (TC, $n=4$) e treinado tratado com dexametasona (TD, $n=4$) no músculo tibial anterior. 31
- Figura 5b:** Análise quantitativa da expressão da proteína COX-2 dos grupos sedentário controle (SC, $n=2$), sedentário tratado com dexametasona (SD, $n=2$), treinado controle (TC, $n=2$) e treinado tratado com dexametasona (TD, $n=2$) no músculo sóleo. 31

Figura 6a: Gel representativo da expressão da proteína VEGF com 2 bandas para cada grupo (painel superior) e análise quantitativa da expressão da proteína VEGF (painel inferior) dos grupos sedentário controle (SC, n=8), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=8), treinado controle (TC, n=8) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=7) no músculo tibial anterior. Significância: $p < 0,05$, + vs. grupo controle. 32

Figura 6b: Gel representativo da expressão da proteína VEGF com 2 bandas para cada grupo (painel superior) e análise quantitativa da expressão da proteína VEGF (painel inferior) dos animais dos grupos sedentário controle (SC, n=8), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=8), treinado controle (TC, n=8) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=8) no músculo sóleo. Significância: $p < 0,05$, + vs. grupo controle e # vs. SD. 32

RESUMO

A dexametasona é um glicocorticóide sintético utilizada em três principais situações: para conter processos inflamatórios agudos, crônicos ou até como droga imunossupressora. Nestes casos o paciente receberá altas doses por um período crônico e, portanto, é muito maior a chance de ocorrência dos efeitos colaterais. Por ser um potente anti-inflamatório, a dexametasona tem promovido efeitos deletérios na via dos ácidos aracdônicos, quando administrada em altas doses. Demonstramos recentemente que reduz significativamente a expressão proteica do fator de crescimento de vasos derivado do endotélio (VEGF), tanto na musculatura esquelética quanto no coração, mas os mecanismos envolvidos neste efeito ainda não estão esclarecidos. Por outro lado, o exercício físico tem se mostrado eficaz no combate a hipertensão arterial, diabetes e dislipidemias, promovendo, entre outros fatores, o aumento de VEGF e da angiogênese. Uma possível explicação para essa criação de novos vasos seria pela via inflamatória, ou seja, por meio da estimulação da formação de produtos do metabolismo dos ácidos aracdônicos (AA), tais como prostaglandina E₂ (PGE₂) e VEGF, por meio do aumento da estimulação das enzimas cicloxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2). Quase nada se sabe sobre os efeitos preventivos do treinamento físico sobre a ação da dexametasona na via dos ácidos aracdônicos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi verificar se o treinamento físico aeróbio, realizado anteriormente e concomitantemente ao tratamento com dexametasona, foi capaz de prevenir e/ou atenuar os efeitos da droga na expressão das proteínas COX-2 e VEGF. Para isso, foram utilizados ratos jovens Wistar (n = 40) divididos aleatoriamente em 4 grupos: Sedentários controle (SC), Sedentários e tratados com dexametasona (SD), Treinados controle (TC) e Treinados e tratados com dexametasona (TD). Os mesmos realizaram treinamento físico aeróbio, a 60% da capacidade máxima, 5 dias por semana, 1 hora por dia, por 70 dias. Nos 10 dias finais de protocolo, os ratos foram tratados, concomitante ao treinamento físico, com dexametasona (0,5mg/kg/dia, *i.p.*). A glicemia de jejum foi mensurada no início e final dos protocolos de exercício e tratamento farmacológico. Os animais foram pesados semanalmente durante o treinamento e diariamente durante o tratamento com dexametasona. Ao final do protocolo experimental os ratos foram eutanasiados e os músculos sóleo e tibial anterior foram retirados, pesados, homogeneizados e armazenados a -20° C para posterior análise da expressão protéica de COX-2 e VEGF. Todos os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média e foi realizada a análise de variância de dois caminhos (ANOVA) seguidos de post-hoc de Tukey. A dexametasona reduziu o peso corporal dos ratos a partir do quarto dia de tratamento, além de causar atrofia muscular, sendo o treinamento físico insuficiente para reverter esses quadros. Contudo o treinamento físico foi eficaz em aumentar a capacidade física dos animais, em atenuar a hiperglicemia e em conter os efeitos colaterais da droga na expressão da proteína VEGF nos músculos de fibras vermelhas. Dessa forma, o protocolo utilizado foi efetivo em proteger os ratos dos efeitos colaterais da dexametasona.

Palavras chave: Glicocorticóides, exercício físico, músculo esquelético, angiogênese, ácidos aracdônicos.

ABSTRACT

Dexamethasone is a synthetic glucocorticoid widely used to treat allergic and inflammatory processes. This drug is used in three main situations, are used to contain acute or chronic inflammatory processes, or like immunosuppressive drug's. In these cases the patient will receive high doses for a chronic period and, therefore, has a much greater chance of adverse side effects, such as hypertension, diabetes and dyslipidemia. Dexamethasone promotes deleterious effects on the arachidonic acid pathway, when administered in high doses, because it is a potent anti-inflammatory drug. We recently demonstrated that dexamethasone significantly reduces the protein expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in both skeletal muscle and heart, but the mechanisms involved remain unclear. Meanwhile, exercise has been shown to be effective against high blood pressure, diabetes and dyslipidemia, promoting, among other factors, the increase in VEGF and angiogenesis. One possible explanation for these effects would be the creation of new vessels mediated by inflammation, or by the stimulation of the formation of products of the metabolism of arachidonic acid (AA), such as prostaglandin E2 (PGE2) and VEGF, by increasing the stimulation of the enzymes cyclooxygenase 1 and 2 (COX-1 and COX-2). Little is known about the preventive effects of training on the action of dexamethasone in the arachidonic acid pathway. Therefore, the aim of this study was to determine whether aerobic exercise training, performed before and concomitant treatment with dexamethasone, was able to prevent the effects of the dexamethasone in the protein expression of COX-2 and VEGF. For this, we used young Wistar rats (n = 40) which were randomly divided into 4 groups: sedentary control (SC), sedentary and treated with dexamethasone (SD), trained control (TC) and trained and treated with dexamethasone (TD). These rats performed aerobic exercise training, 60% of maximum capacity, 5 days per week, one hour per day for 70 days. Within 10 days of the final protocol, the rats were treated concomitantly with the physical training with dexamethasone (0.5 mg / kg / day, ip). Fasting plasma glucose was measured at the beginning and the end of the exercise protocols and pharmacological treatment. Additionally, the animals were weighed weekly during training and daily during treatment with dexamethasone. At the end of the experimental protocol the rats were euthanized and the soleus and tibialis anterior muscles were removed, weighed, homogenized and stored at -20°C for analysis of protein expression of COX-2 and VEGF. All results were presented as a mean \pm one standard error of the mean which were analyzed using a two-way analysis of variance followed by a post hoc Tukey's test. Dexamethasone reduced body weight of rats with the start at the fourth day of treatment and cause muscle atrophy. For both situations, the physical training was insufficient to reverse these conditions. However, the physical training was effective in increasing the physical capacity of animals, in attenuate hyperglycemia and in contain the effects of the drugs in the expression of VEGF protein in red muscle fibers. Thus, the protocol used was effective in protecting mice from the side effects of dexamethasone.

Key words: Glucocorticoids, exercise, skeletal muscle, angiogenesis, arachidonic acid.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Efeitos do tratamento com dexametasona na musculatura esquelética	17
1.2 Efeitos do exercício físico	19
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Materiais	23
3.2 Métodos	23
3.3 Avaliação da capacidade física máxima dos animais	23
3.4 Grupos experimentais	24
3.5 Protocolo de treinamento físico	24
3.6 Protocolo de tratamento e medida de glicemia	25
3.7 Retirada dos músculos esqueléticos	25
3.8 Protocolo de dosagem de proteínas	26
3.9 Procedimentos de Western Blotting	26
3.1.1 Métodos Estatísticos	27
4 RESULTADOS	28
5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	33
5.1 Dificuldades encontradas	35
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

O cortisol é um hormônio produzido no córtex adrenal do ser humano sob controle do hormônio adrenocorticotrófico e regulado pelo eixo hipotatâmico-hipofisário-adrenal, sob um circuito de feedback neuroendócrino. Normalmente, o cortisol é ativado e tem sua produção e liberação em situações de muito estresse como, por exemplo, ao final de exercícios de longa duração e na reação de luta ou fuga. Sua liberação tem como principal finalidade mobilizar substratos energéticos para recuperar tecidos lesionados e restabelecer o metabolismo basal (FARIA e LONGUI., 2006).

A dexametasona é um glicocorticóide sintético amplamente utilizado no tratamento de processos inflamatórios e alérgicos. Essa droga farmacológica é utilizada em três principais situações: para processos inflamatórios agudos, com o intuito de diminuir o edema; processos inflamatórios crônicos, como por exemplo, em artropatias, e como imunossupressor, por exemplo, em doenças auto-imunes ou para evitar a rejeição de enxertos. Nestes casos o paciente receberá altas doses por um período crônico e, portanto, é muito maior a chance de ocorrência dos efeitos colaterais.

Dentre os vários efeitos colaterais, tem sido demonstrado que uma simples dose de dexametasona pode ser responsável por alterar significativamente o metabolismo glicolítico cardíaco, bem como o metabolismo de ácidos graxos livres em animais (QI et al., 2004) e produzir intolerância à glicose em humanos (SCHNEITER e TAPPY, 1998). Cronicamente, tem sido demonstrado que a dexametasona determina resistência periférica à insulina, acompanhada de hiperglicemia e hiperinsulinemia, perda de peso corporal, atrofia muscular e hipertensão (BAREL et al., 2010; BROTMAN et al., 2005; PATEL et al., 2006; PEREZ 2007, proc. FAPESP 06/51935-6; CODERRE et al., 2007; SANTOS et al., 2007; RAFACHO et al, 2007; GIOZZET et al, 2008; LOUZADA 2009, processo fapesp nº 2008/00821- 6; DIONÍSIO et al, 2009; DIONÍSIO et al. 2010; AMARAL et al, 2010 (a) e AMARAL et al, 2010 (b)). Trabalhos recentes do nosso laboratório têm investigado os possíveis mecanismos induzidos pela dexametasona que possam estar contribuindo para o aumento da resistência periférica à insulina e verificaram alterações das proteínas responsáveis pela captação periférica de glicose na musculatura esquelética (LOUZADA 2009, proc. nº 2008/00821- 6; AMARAL et al., 2010 (b); DIONÍSIO et al., 2010 e BAREL et al., 2010). Além disso, os resultados do laboratório demonstraram, pela primeira vez, que o exercício aeróbio realizado previamente ao tratamento com dexametasona atenua alguns dos efeitos colaterais relacionado à captação periférica a glicose, melhorando consequentemente a resistência à

insulina (LOUZADA 2009, proc. FAPESP nº 2008/00821- 6; DIONÍSIO et al, 2010; BAREL et al., 2010 e AMARAL et al, 2010b).

1.1 Efeitos do tratamento com dexametasona na musculatura esquelética

Resultados recentes do nosso laboratório (BAREL et al, 2010) demonstraram que o tratamento crônico, com alta dose de dexametasona, determina redução significativa do fator de crescimento de vasos (VEGF), que não é atenuada pelo exercício físico realizado anteriormente. Esta redução de VEGF pode estar determinando uma rarefação, como demonstrada por Vogt e Schmid-Schonbein (2001). Em concordância, outros autores também demonstraram redução significativa de VEGF após tratamento crônico com dexametasona em diferentes tecidos do organismo (HEISS et al., 1996; MACHEIN et al., 1999; HA et al., 2002; KOEDAM et al., 2002; IWAI et al., 2004; KANERVA et al., 2008) e na glândula adrenal (MALLET et al., 2003).

VEGF é uma glicoproteína ativa de 46-kDa, considerada um dos principais fatores mitogênicos conhecidos até hoje (FERRARA et al., 1992). Existem cinco diferentes moléculas de VEGF identificadas em humanos, as quais são compostas por 121, 145, 165, 189 e 206 aminoácidos, respectivamente. O VEGF₁₆₅ é a espécie molecular predominante e a principal isoforma ativa (HOUK et al., 1992; ZACHARY., 2001). Diversas evidências têm demonstrado que o VEGF está envolvido na regulação de processos angiogênicos, fisiológicos e patológicos *in vitro* (OTANI et al., 1998, WILLIANS et al., 1998 e ZHENG et al., 2001) e *in vivo* (FERRARA et al., 1992; HUDLICKA and BROWN , 1996; FERRARA, 1999; RICHARDSON et al., 2000; AMARAL et al., 2001a, b e c). A angiogênese é um processo complexo e de várias etapas que está intimamente regulado por moléculas que induzem ou inibem a neovascularização (CARLILE et al., 2001; POLVERINI, 2002; KOHNO et al., 2003). O VEGF tem sido demonstrado ser estimulado por vários mecanismos, entre eles a hipóxia (KANERVA et al., 2008), o óxido nítrico (GAVIN et al., 2000), a Angiotensina II (AMARAL et al., 2001a e b) e a PGE₂ (INOUE et al., 2002; JAIN et al., 2008; HORI et al., 2010). Dentre estes vários mecanismos, a via dos ácidos aracdônicos parece ser significativamente afetada pela dexametasona, uma vez que esta droga farmacológica é um potente anti-inflamatório.

Em condições inflamatórias, a enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) atua na formação dos ácidos aracdônicos (AA), os quais são catalisados pelas enzimas cicloxigenase-1 e cicloxigenase-2 (COX-1 e COX-2). A COX-2, por sua vez, é responsável pela formação de

prostaglandina E₂ - PGE₂ (VANE et al., 1998; HARRIS AND BREYER, 2001; KIM et al., 2006) entre outros produtos, tais como tromboxana e prostaciclina. Tem sido demonstrado que a PGE₂ pode atuar em um dos seus receptores (EP2 e EP4) na promoção do VEGF (INOUE et al., 2002; JAIN et al., 2008; HORI et al., 2010) e, conseqüentemente, facilita o processo de angiogênese, que é definido como crescimento de vasos a partir de vasos pré existentes (HALABY et al., 2002). Da mesma forma, Amaral et al. (2003) já haviam demonstrado o envolvimento do 20-HETE (20-hidroxicosatetraenoico), um produto do metabolismo dos ácidos aracdônicos na expressão de VEGF.

As Cicloxigenases (COXs) são enzimas responsáveis pelo catabolismo dos AA na biossíntese de prostaglandina (PG) e, posteriormente, em alguns substratos como PGE₂, PGF₂, PGD₂, PGI₂, and TXA₂. A atividade biossintética das duas isoformas podem ser inibidas pelo uso de drogas antiinflamatórias não esteroidais. Ambas as formas (COX-1 e COX-2) possuem peso molecular de 69kDa com 63% de homologia em humanos. A atividade da COX-1 é constitutiva e está presente em todos os tipos de células, em concentrações constantes, sendo responsável por sintetizar prostaglandinas de proteção que visam preservar a integridade do revestimento do estômago e manter função renal normal em um rim comprometido. Já a atividade da COX-2 é normalmente ausente nas células e quando induzida, sua concentração aumenta e diminui logo após o estímulo dado. Além disso, a COX-2 está intimamente ligada com a inflamação, controle do crescimento celular, ovulação, angiogênese necessária à placenta e possivelmente na transmissão nervosa. (VANE et al., 1998). A mesma pode ainda ser encontrada em diversos tecidos como, por exemplo, coração, diafragma, músculos esqueléticos de fibras brancas e vermelhas, rins, entre outros. (SUDBO et al, 2003; TESTA et al 2007).

Em altas doses, tem sido demonstrado que a dexametasona reduz de forma significativa os produtos desta via inflamatória, por exemplo, PGE₂ e VEGF, determinando sérios efeitos colaterais, tais como rarefação, apoptose e hipertensão (VOGT e SCHMID-SCHONBEIN, 2001; CASTRO et al., 2004; BAREL et al., 2010; AMARAL et al, 2010 (d)). Fournier et al. (1997) já haviam demonstrado que 1 µM de dexametasona era capaz de reduzir significativamente tanto o conteúdo de mRNA para COX-1 e COX-2, quanto a expressão de PGE₂ e PGD₂ em macrófagos. Concordando com estes resultados, Croxtall et al. (2000 e 2003) comprovaram que, independente da dose, a dexametasona acarretava em redução significativa da expressão de ácidos aracdônicos em células carcinômicas A549. Luo et al. (2009) observaram que a dexametasona reduz a expressão de PGE₂ e COX-2 em células da mucosa gástrica de ratos com inflamação induzida pelo TNFα.

Estes resultados foram confirmados mais recentemente *in vivo* e *in vitro*. Hirasawa et al. (2010) mostraram que 1,65 mg/kg de dexametasona foi eficaz em reduzir os níveis de mRNA para COX-2 em tecidos cutâneos, subcutâneos e musculares (homogeneizados em conjunto). Além disso, Myers et al. (2009) demonstraram que 1 μ M ou 3 μ M de dexametasona são eficientes em reduzir os níveis de PGE₂ em células sanguíneas. Dados preliminares do laboratório mostraram que o tratamento crônico com 1mg/kg/dia de dexametasona, em ratos, era capaz de reduzir significativamente a expressão de VEGF, tanto em músculo esquelético quanto em músculo cardíaco (PEREZ 2007, processo FAPESP # 06/51935-6, BAREL et al., 2010) o que pode determinar problemas na neovascularização (CASTRO et al., 2004). Contudo os mecanismos responsáveis por estes efeitos da dexametasona na expressão de VEGF ainda não estão totalmente esclarecidos.

1.2 Efeitos do exercício físico

O exercício físico crônico tem sido amplamente utilizado nos últimos anos com finalidade preventiva e principalmente terapêutica de uma série de condições fisiopatológicas como o diabetes, a hipertensão arterial, a obesidade e a dislipidemia devido ao seu efeito compensatório e regulatório em vários tecidos do organismo (MOTA e ZANESCO, 2007; GUEDES e GONÇALVES, 2007, AMARAL et al., 2008; COIMBRA et al., 2008; BAREL et al., 2010).

O exercício físico promove efeitos centrais e periféricos, diminui atividade nervosa simpática (ROVEDA et al., 2003) e, na musculatura esquelética, o exercício crônico promove aumento do número e do tamanho das mitocôndrias (CEJUDO et al., 2005; HUNTER et al., 2005), hipertrofia muscular (GALVÃO et al., 2005) e aumento na densidade de vasos (AMARAL et al., 2001a; AMARAL et al., 2003; MELO et al., 2003; AMARAL et al., 2008) melhorando, assim, o metabolismo oxidativo.

Diversos autores vêm demonstrando que o exercício físico agudo ou de curta duração pode aumentar significativamente a expressão gênica ou proteica de COX-2 e VEGF (AMARAL et al., 2008; OLFERT et al., 2001; WEINHEIMER et al., 2007; BUFORD et al., 2009), o que poderia contribuir para aumentar o número de vasos na musculatura esquelética e cardíaca. Weinheimer et al. (2007), revelaram que uma sessão de exercício resistido aumentou os níveis de mRNA para COX-2 tanto 4 horas, quanto 24 horas após o exercício físico em músculos esqueléticos de homens e mulheres não obesos, contudo não houve diferença estatística na expressão proteica da COX-2. Da mesma forma, Buford et al. (2009)

demonstraram, mais recentemente, que uma sessão de exercício em esteira aumentava significativamente o conteúdo de mRNA de COX-2 no músculo vasto lateral de homens recreacionalmente ativos após 3 horas de exercício, porém retornava ao basal após 24 horas. Marini et al. (2007), demonstraram que 14 semanas de treinamento físico de baixa intensidade em esteira foi capaz de aumentar os níveis de COX-2 no coração de ratos. Concordando com estes resultados, Jiménez et al. (2008) verificaram um aumento de mRNA e proteína para COX-2 em células mononucleares do sangue periférico após exercício agudo, tanto em homens saudáveis treinados (8 semanas de treinamento resistido excêntrico), quanto em homens não treinados e este aumento perdurou por 3 horas. Chiang et al. (2009) mostraram que 5 dias de exercício excêntrico em esteira (-16° de inclinação) a 16m/min de velocidade, foi efetivo em aumentar a expressão protéica de COX-2 em músculos esqueléticos de ratos. Além disso, Soltow et al. (2010) também observaram que 1 hora de alongamento cíclico de células C2C12, resultou em aumento no conteúdo de mRNA para COX-2. Por outro lado, alguns autores não encontraram aumentos significativos de COX-2 nem após exercício agudo (BURD et al., 2010) nem crônico (DEMARZO et al., 2008).

A expressão de VEGF também é rapidamente estimulada pelo exercício. Olfert et al. (2001) observaram aumentos de mRNA de VEGF após uma sessão de exercício e mais recentemente, Amaral et al. (2008) demonstraram que 3 dias de exercício aeróbico foram efetivos para aumentar a expressão proteica de VEGF acompanhada de angiogênese na musculatura esquelética. Além disso, Hoier et al. (2010) observaram que treinamento de movimento passivo foi eficiente em aumentar a expressão de VEGF, o número de capilares por fibra e ainda a angiogênese no músculo vasto lateral de humanos. No entanto, tem sido demonstrado que o treinamento físico não altera significativamente a expressão de VEGF (OLFERT et al., 2001; AMARAL et al., 2008; BAREL et al., 2010).

Portanto, baseado nos dados acima expostos, acredita-se que a dexametasona, em altas doses, atua na via anti-inflamatória, atenuando a expressão de VEGF via inibição da formação de PGE2 pela COX-2. Da mesma forma, sabe-se que o exercício físico promove efeitos opostos, ou seja, aumenta a expressão de COX-2, PGE2 e VEGF. No entanto, quase nada se sabe sobre os efeitos preventivos do treinamento físico sobre os efeitos da dexametasona na via inflamatória. Dados preliminares do laboratório (BAREL et al, 2010 e PEREZ 2007, processo FAPESP # 06/51935-6) demonstraram que o tratamento crônico com dexametasona determinou redução significativa de VEGF na musculatura esquelética e cardíaca e o exercício realizado anteriormente não foi capaz de prevenir esta redução. No entanto, os mecanismos que explicam este efeito ainda precisam ser melhor investigados, além da análise

de diferentes dosagens. Este trabalho tem como hipótese que o exercício físico possa atenuar a redução de VEGF e COX-2 induzidos por tratamento com dexametasona quando menores doses são administradas.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A utilização de glicocorticóides sintéticos para o controle de processos inflamatórios e alérgicos vem crescendo muito. Contudo, sabe-se que em altas doses, fármacos, como dexametasona, ocasionam uma série de efeitos colaterais, como rarefação capilar, apoptose e hipertensão. Tem sido observado que a dexametasona atua na via inflamatória inibindo a produção/expressão de proteínas importantes como COX-2 e VEGF, em contrapartida, o exercício físico parece aumentar essa produção/expressão. Quase nada se sabe sobre o efeito de um programa de treinamento físico prevenindo as alterações induzidas pela dexametasona na via inflamatória, portanto, o objetivo geral desse trabalho foi verificar os efeitos preventivos do treinamento físico nas proteínas COX-2 e VEGF na musculatura esquelética de ratos tratados com dexametasona (0,5mg/kg/dia, *i.p.*).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

A dexametasona (Decadron[®]) foi adquirida da Ache (Campinas, SP, Brasil). Thiopental sódico (Thiopentax[®]) foi comprado pela Cristália (Itapira, SP, Brasil). Todos os químicos e materiais utilizados para western blotting foram comprados da Sigma (St. Louis, MO, Estados Unidos) e Bio-Rad (Hercules, CA, Estados Unidos). Foram utilizados os anticorpos primários para VEGF (#G143-850, mouse monoclonal, Pharmingen) e COX-2 (#ab15191, anti-rabbit polyclonal, Abcan) e os secundários Anti – Mouse e Anti - Rabbit IgG (H+L)- HRP Conjugated (#170-6515, Bio-Rad, Hercules, CA, United States), respectivamente. Luminescência química aumentada foi o Super Signal Pico (Pierce[®]).

3.2 Métodos

Foram utilizados 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 quatro animais, no biotério da Faculdade de Ciências 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).

3.3 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 ferro). Após esta pré-seleção, eles realizaram um teste de esforço máximo (TEM-1), utilizando um 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 conseguiu 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 tem 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.

3.4 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, somente solução salina, *i.p.* (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, *i.p.*) – (SD).

Grupo 3: 10 animais que foram submetidos a um protocolo de treinamento físico por 8 semanas e não receberam tratamento com dexametasona, somente solução salina, *i.p.* (TC)

Grupo 4: 10 animais submetidos a um protocolo de treinamento físico por 8 semanas seguido de tratamento com dexametasona por 10 dias (0,5 mg/kg/dia, *i.p.*) – (TD). Os animais treinados 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.

3.5 Protocolo de treinamento físico

O treinamento físico foi realizado em esteira ergométrica 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 e no período de uma hora. A figura 1 representa a linha do tempo do protocolo experimental.

3.6 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 um 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 1).

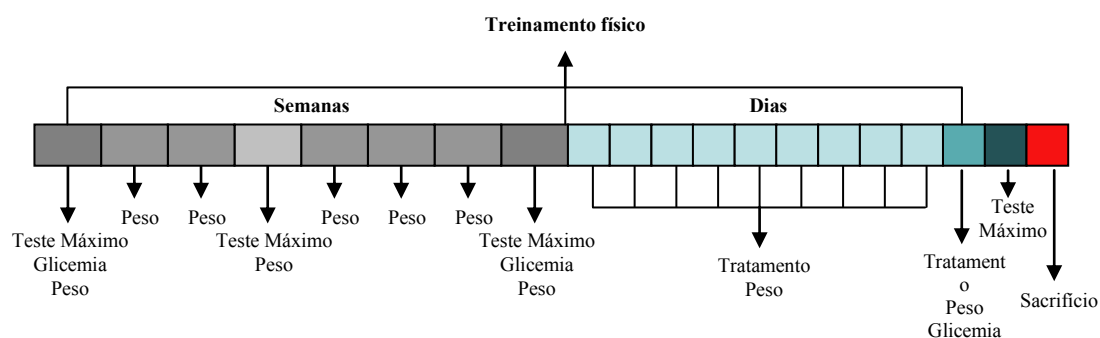


Figura 1. Linha do tempo do protocolo experimental

3.7 Retirada dos músculos esqueléticos

Após os protocolos experimentais, os animais foram eutanasiados por excesso de anestésico ANASEDAN® (cloridrato de xilasina) e DOPALEN® (cloridrato de quetamina), VETBRANDS do Brasil (1:1, 1mg/kg de peso corporal). Os músculos esqueléticos (sóleo e tibial anterior, TA) foram removidos, limpos e imediatamente pesados. Os tecidos foram homogeneizados com um homogeneizador Polytron em uma solução RIPA concentrado 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 proteica. Os tecidos não homogeneizados foram armazenados em freezer -80°C.

3.8 Protocolo de dosagem de proteína

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, 2001b). Este procedimento foi realizado em colaboração com o Laboratório do Prof. Titular Carlos Ferreira dos Santos, na FOB/USP. Após a dosagem as amostras foram estocadas a -20°C até serem utilizadas para os experimentos de Western Blotting.

3.9 Procedimentos de *Western Blotting*

A proteína foi eletroforéticamente separada por tamanho, usando-se um sistema de gel de poliacrilamida conforme publicação prévia do laboratório (AMARAL et al, 2001b). Basicamente, foi utilizado um 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 de transferência consistiu de: 190 mM de glicina, 25 mM de Tris, 0,1% de SDS, pH 8,3. As amostras (60 μg para COX-2 e 30 μg para VEGF) foram colocadas para correr por 50 minutos a 200 V. Marcadores de peso molecular foram simultaneamente utilizados como tamanho padrão. As proteínas foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose com aplicação de corrente de 120V por 1 hora e meia em um tampão que consistiu de: 190 mM de glicina, 25 mM de Tris, 20% de metanol, pH 8,3. Logo após a transferência, a equivalência da quantidade de proteína colocada em cada coluna foi conferida com a colocação com *Ponceau*. As membranas foram lavadas em solução basal (Tris 1M, NaCl 5M, Tween 20), 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 humano (1:1000, em leite desnatado). As membranas foram então lavadas e incubadas com um anticorpo secundário, IgG anti-coelho e anti mouse (COX-2 e VEGF, respectivamente), por 2 horas. 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, Corporation).

3.1.1 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 físico 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 as repetições foram as semanas e dias. As amostras que apresentaram interação foram posteriormente analisadas pelo post-hoc de Tukey. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Os ratos foram pesados semanalmente durante as 8 semanas de treinamento e diariamente durante os 10 dias de tratamento. Pode-se observar na Figura 2 que os ratos apresentavam o mesmo peso corporal no início do protocolo experimental e, como esperado, este peso corporal aumentou significativamente semana a semana até o final do treinamento. Ao final da 8ª semana de treinamento, os 10 dias de tratamento com a droga foram iniciados (0,5 mg/kg/dia, *i.p.*). Conforme demonstrado na Figura 2, o tratamento com a Dexametasona determinou redução significativa do peso corporal a partir do 4º dia, sendo o treinamento físico ineficaz em reverter esse quadro.

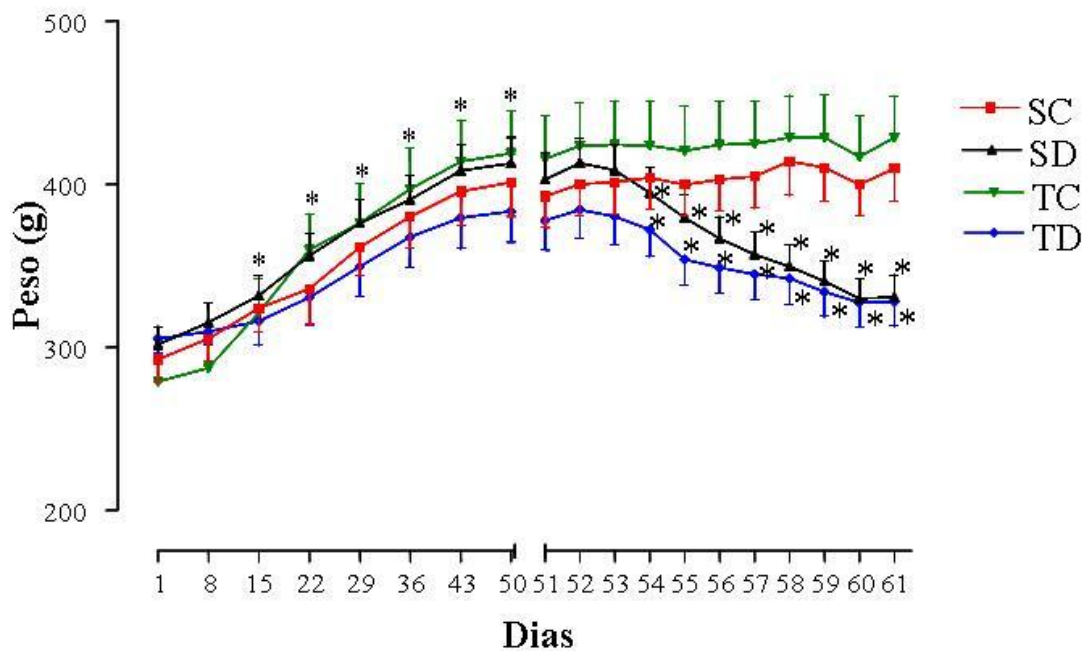


Figura 2: Evolução do peso dos ratos durante as 8 semanas de treino (parte esquerda do gráfico) e os 10 dias de tratamento com o fármaco (parte direita do gráfico). Sedentário controle (SC, n=10), sedentário e tratado com dexametasona (SD, n=10), treinado controle (TC, n=10) e treinado e tratado com dexametasona (TD, n=10). Significância: * VS início, $p < 0,05$, para todos os grupos analisados.

A Tabela 1 ilustra os valores de peso corporal no dia da eutanásia e os pesos musculares dos animais. Pode-se observar que o tratamento crônico com dexametasona reduziu significativamente o peso muscular dos ratos (normalizados pelo tamanho da tíbia) e o treinamento físico realizado prévia e concomitantemente com o tratamento não foi capaz de atenuar essa queda.

Tabela 1: Peso corporal e muscular dos animais no final do protocolo experimental.

Grupo	Peso corporal (g)	Tíbia (cm)	TA (g)	TA/Peso (mg/kg)	TA/Tíbia (kg/cm)	Sóleo (g)	Sóleo/Peso (mg/kg)	Sóleo/Tíbia (kg/cm)
SC	415,11	4,07	0,73	1,77	178,28	0,18	0,438	44,65
SD	338,38	4,09	0,56	1,68	137,48+	0,17	0,49	40,49
TC	413,67	4,04	0,74	1,83	183,78	0,21	0,51	51,72
TD	337,75	4,18	0,60	1,76	142,93+	0,16	0,48	39,40+

SC (sedentário controle, n=10), SD (sedentário e tratado com dexametasona, n=10), TC (treinado controle, n=10), TD (treinado e tratado com dexametasona, n=10). Significância: + vs grupo controle, $p < 0,05$.

O treinamento físico foi bastante efetivo em aumentar a capacidade física dos ratos, pois enquanto os ratos sedentários percorreram uma distância de 135 metros no ultimo teste máximo, os ratos treinados percorreram 505 metros, o que representa um aumento de 370 metros (73%). Com isso, pode-se observar na figura 3 que os ratos treinados correram 316 metros a mais, quando comparados o 1° e 3° testes máximos, enquanto os ratos sedentários correram 39 metros a menos.

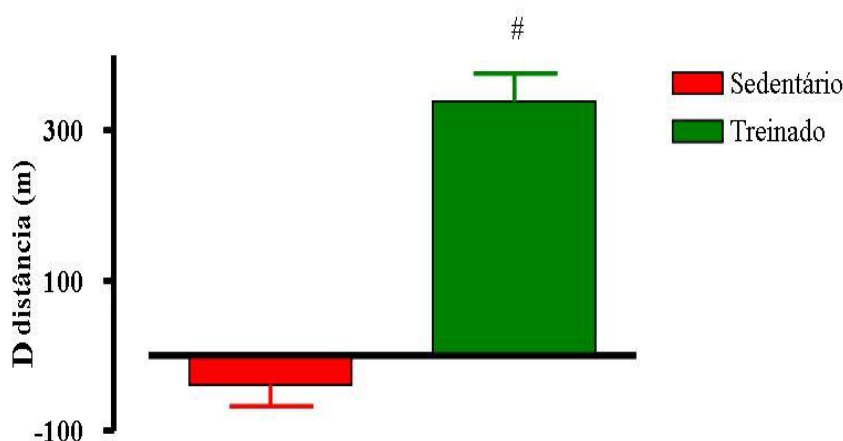


Figura 3. Δ da distância percorrida (em metros) pelos ratos sedentários (n=20) e treinados (n=20) no 1° e 3° testes máximos. Significância: # VS. sedentário, $p < 0,05$.

O comportamento glicêmico dos ratos de todos os grupos foi semelhante durante todo o treinamento, pois se tratavam de animais normoglicêmicos. Contudo, o tratamento farmacológico (após a 2ª avaliação) determinou aumento de 88% na glicemia de jejum dos animais sedentários, como pode ser observado na Figura 4. Por outro lado, o treinamento físico foi efetivo em atenuar a hiperglicemia dos ratos tratados com dexametasona (Figura 4).

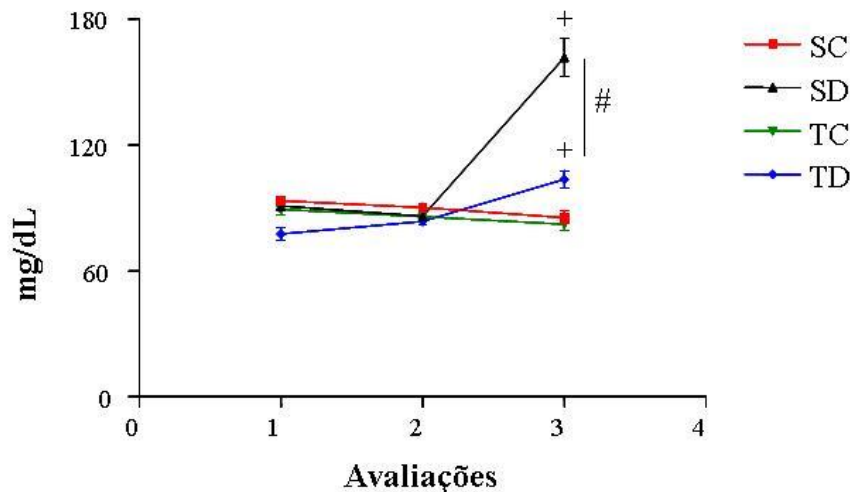


Figura 4: Valores de Glicemia de jejum antes e após o treinamento (1ª e 2ª avaliações, respectivamente) e após o tratamento com 0,5 mg/kg/dia – *i.p.* (3ª avaliação) nos ratos SC (sedentários controles, n = 10), SD (sedentários dexametasona, n = 10), TC (treinados controles, n = 10), TD (treinados dexametasona, n = 10). Significância: # VS. sedentário, + VS. Grupo controle $p < 0,05$.

As Figuras 5a e 5b, representam, respectivamente, a expressão de COX-2 no músculo tibial anterior (n=4) e sóleo (n=2). Observa-se que a dexametasona causa redução da expressão de COX-2 tanto no músculo tibial anterior, quanto no sóleo. Além disso, o treinamento físico aeróbio não conseguiu proteger essa alteração no músculo tibial anterior. Para o resultado da COX-2 no músculo sóleo, não foram feitas análises estatísticas, pois o número de ratos era muito reduzido.

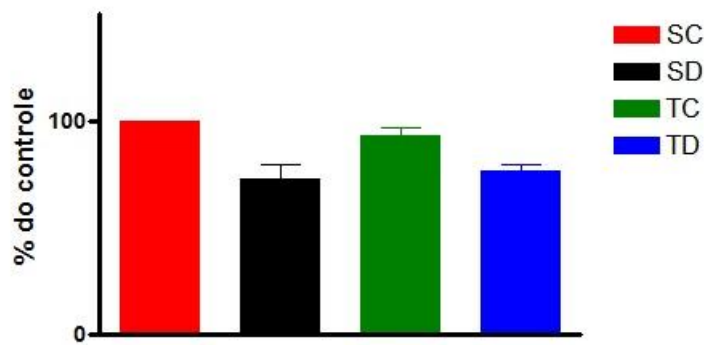


Figura 5a: Análise quantitativa da expressão da proteína COX-2 dos grupos sedentário controle (SC, n=4), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=4), treinado controle (TC, n=4) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=4) no músculo tibial anterior.

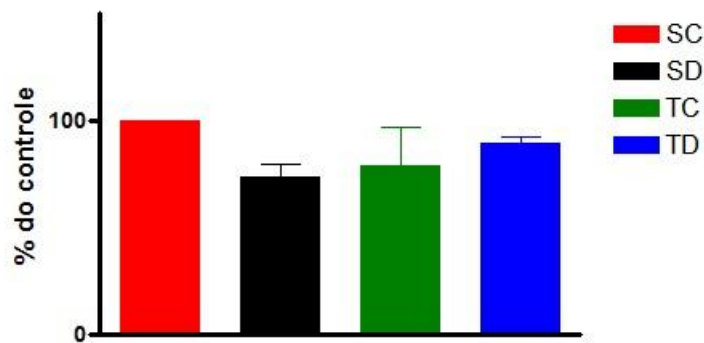


Figura 5b: Análise quantitativa da expressão da proteína COX-2 dos grupos sedentário controle (SC, n=2), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=2), treinado controle (TC, n=2) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=2) no músculo sóleo.

Pode-se observar no gráfico da figura 6a que o tratamento de 10 dias com 0,5mg/kg/dia de dexametasona reduziu a expressão de VEGF no músculo tibial anterior e que o treinamento físico não foi capaz de atenuar essa queda. Por outro lado, apesar do tratamento crônico com dexametasona reduzir a expressão de VEGF também no músculo sóleo, o treinamento físico atenua esta redução. (gráfico da figura 6b).

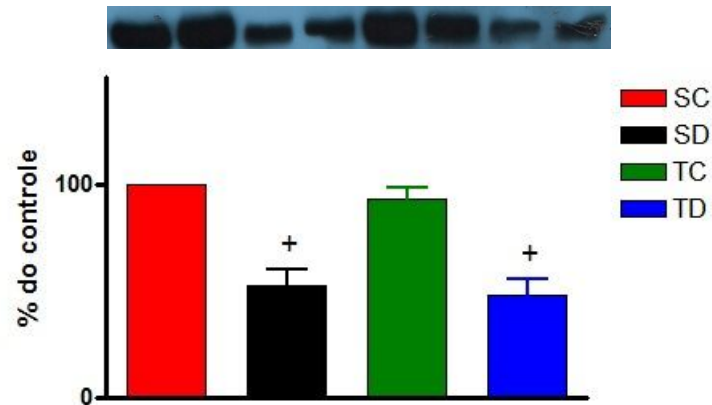


Figura 6a: Gel representativo da expressão da proteína VEGF com 2 bandas para cada grupo (painel superior) e análise quantitativa da expressão da proteína VEGF (painel inferior) dos grupos sedentário controle (SC, n=8), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=8), treinado controle (TC, n=8) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=7) no músculo tibial anterior. Significância: $p < 0,05$, + vs. grupo controle.

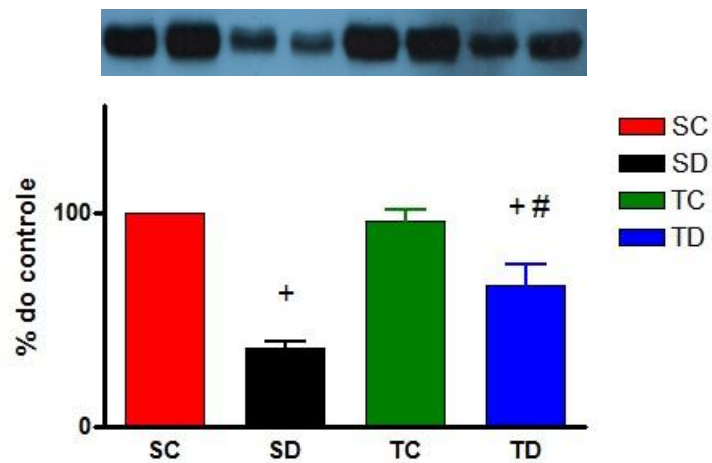


Figura 6b: Gel representativo da expressão da proteína VEGF com 2 bandas para cada grupo (painel superior) e análise quantitativa da expressão da proteína VEGF (painel inferior) dos animais dos grupos sedentário controle (SC, n=8), sedentário tratado com dexametasona (SD, n=8), treinado controle (TC, n=8) e treinado tratado com dexametasona (TD, n=8) no músculo sóleo. Significância: $p < 0,05$, + vs. grupo controle e # vs. SD.

5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A utilização crônica da dexametasona visando conter processos inflamatórios e alérgicos tem evidenciado uma série de efeitos colaterais, com isso, diversos estudos vêm enfatizando a importância do treinamento físico no controle desses malefícios.

Pode-se observar neste estudo que o tratamento com 0,5 mg de dexametasona durante os 10 dias finais de protocolo resultou em redução significativa do peso corporal, tanto dos ratos treinados, quanto dos ratos sedentários, a partir do 4º dia de tratamento. Esse quadro já é bastante conhecido na literatura, independente da dosagem utilizada. Estudos anteriores do nosso laboratório comprovaram que, o tratamento também por 10 dias, porém com 1 mg/kg/dia de dexametasona, acarretou em perda de peso corporal, sendo o treinamento físico ineficaz em atenuar essa queda. (BAREL et al 2010). Concordando com esses achados, Ma et al, (2003), também verificaram perda de peso corporal significativa (4%) utilizando uma dosagem de 0,6 mg/kg por dia de dexametasona. Uma diferença considerável no presente estudo é que, enquanto o peso corporal dos ratos tratados com 1mg de dexametasona decai a partir do primeiro dia (BAREL et al 2010) ou terceiro dia (GILSON et al 2007), os ratos tratados com 0,5mg começam a perder peso corporal apenas a partir 4º dia de tratamento. Contudo, para ambas as dosagens, a perda de peso corporal não foi atenuada pelo treinamento físico realizado anteriormente ao tratamento.

A atrofia muscular tem sido apontada como um desbalanço entre fatores hipertróficos e atroficos que controlam o crescimento muscular. Ma et al (2003), Gilson et al (2007) e mais recentemente Barel et al (2010), demonstraram que o uso crônico de dexametasona a 0,6mg/kg e 1 mg/kg/dia, promovia uma perda significativa de peso corporal acompanhada de atrofia muscular. Dessa forma, outro resultado deste estudo também vai ao encontro da literatura e dos resultados de nosso laboratório (DIONÍSIO et al, 2009; BAREL et al 2010), ou seja, pode-se observar que o tratamento com dexametasona, seja com 0,5mg ou 1mg/kg/dia, causa atrofia muscular, principalmente em músculo de fibra branca. Nota-se que o músculo tibial anterior sofreu com os efeitos colaterais do tratamento com a droga e que, mais uma vez, o treinamento aeróbio e de baixa/moderada intensidade não foi efetivo. Já o músculo sóleo (predominância vermelha) não sofreu com efeitos do fármaco e manteve seu peso mesmo durante os 10 dias de tratamento.

Outro importante efeito colateral da dexametasona é o aumento significativo da glicemia de jejum dos animais o que contribui para o desenvolvimento de hiperglicemia, seguida de hiperinsulinemia. (RAFACHO et al., 2007; SANTOS et al, 2007; GIOZZET et al,

2008; DIONÍSIO et al, 2010; BAREL et al., 2010). Resultados recentes do laboratório (BAREL et al., 2010) demonstraram que 1mg/kg por dia de dexametasona era capaz de aumentar em 136% a glicemia de jejum dos animais. Além disso, os resultados do presente projeto confirmam estes resultados e demonstram de forma coerente que, em doses menores, a droga produz menores efeitos. Neste presente estudo, 0,5 mg/kg por dia determinou aumento significativo na glicemia dos animais sedentários de +88%.

Por outro lado, observa-se uma resposta positiva do treinamento físico aeróbico de 8 semanas na glicemia dos animais, porque apesar dos animais treinados também apresentarem seus valores de glicemia de jejum maiores, a porcentagem foi bem menor (+21%) do que o grupo sedentário. Assim o treinamento físico destaca-se como grande aliado ao atenuar a hiperglicemia causada pelo tratamento com este potente anti-inflamatório.

Outros autores também demonstraram redução significativa na expressão da proteína VEGF após tratamento crônico com dexametasona em diferentes tecidos do organismo (HEISS et al., 1996; MACHEIN et al., 1999; HA et al., 2002; KOEDAM et al., 2002; IWAI et al., 2004; KANERVA et al., 2008) e na glândula adrenal (MALLET et al., 2003). Dessa forma, ainda na perspectiva de que quanto menor a dose de dexametasona, melhor será o efeito do treinamento físico, verificou-se no presente estudo que o treinamento físico é capaz de atenuar a diminuição da proteína VEGF no músculo sóleo com o tratamento com 0,5mg, diferentemente do tratamento com 1mg contido na literatura (BAREL et al 2010), mediante o qual o treinamento físico não conseguiu o mesmo efeito. Contudo, o músculo tibial anterior não respondeu ao treinamento, talvez pelo fato do treinamento aeróbico ativar prioritariamente as fibras vermelhas.

Além disso, concordando com Luo et al 2009 e HIRASAWA et al 2010, a dexametasona causou diminuição na expressão da proteína COX-2 nos músculos sóleo e tibial anterior. Sendo o treinamento físico, novamente insuficiente para atenuar essa redução no músculo tibial anterior. Certamente, será necessário uma amostra maior, para que possa ficar comprovado o real efeito, tanto do treinamento, quanto do tratamento.

Com isso, nota-se que o tratamento crônico com dexametasona por 10 dias (0,5mg/kg/dia, *i.p.*) causa uma série de efeitos colaterais como: perda de peso, atrofia muscular, hiperglicemia e aparente diminuição da expressão proteica de COX-2 e VEGF, sendo o treinamento físico um aliado para conter esses malefícios.

5.1 Dificuldades encontradas

Foram três, as maiores dificuldades encontradas. Primeiramente na aquisição dos ratos, pois os animais são transportados do Biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) para Bauru mensalmente. Contudo, devido a alguns problemas, o transporte dos animais não aconteceu da forma desejada durante o ano de 2011, o que atrasou todo o cronograma. Utilizamos para tanto os animais que já estavam no laboratório, caso contrário não seriam possíveis os resultados para esta monografia.

A segunda grande dificuldade foi com as análises de Western Blotting, principalmente para a expressão da proteína COX-2. Como não era uma proteína realizada de rotina no laboratório tivemos que demandar certo tempo para a padronização. Neste sentido, fizemos modificações na quantidade de proteína sugerida na literatura (e diferente do que outros membros do laboratório utilizam no músculo miocárdio), tempo de corrida, número de lavagens e tempo de incubação com o anticorpo. Apenas 50ug de proteína é necessária para avaliar COX-2 no coração, mas essa quantidade era insuficiente para o músculo esquelético. Tentamos diversas dosagens diferentes mas não encontramos a ideal, talvez por problema no próprio anticorpo.

Por fim, a maior dificuldade foi ter passado em um concurso público para técnico de laboratório na FOB-USP/ Bauru, pois quando as coisas começaram a dar certo no laboratório quanto a proteína COX-2, eu tive de assumir meu novo emprego. Essa mudança de rotina acabou inviabilizando a continuação da minha pesquisa, porque eu tive que cancelar minha bolsa de iniciação científica por ter um trabalho rentável e por falta de tempo. Ainda assim, como estou trabalhando em um laboratório, procurei saber se era possível terminar minha monografia na Universidade de São Paulo. Encontrei no laboratório de Bioquímica, alunos desenvolvendo a técnica de Western Blotting e tentei dar continuidade ao meu projeto. Todavia, como o aparato utilizado era mais atual do que eu estava acostumado, não consegui repadronizar meus experimentos a tempo.

Com isso, peço desculpas a comunidade unespiana por não ter concluído meu projeto inicial, mas tenho a certeza de ter contribuído com outros resultados relevantes.

REFERÊNCIAS

AMARAL, S.L; PAPANÉK, P.E.; GREENE, A.S. Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 281, p. H1163 – H1169, 2001 (a).

AMARAL, S.L. et al. Angiogenesis induced by electrical stimulation is mediated by angiotensin II and VEGF. **Microcirculation**, v. 8, n.1, p. 57-67, 2001 (b).

AMARAL, S.L; ROMAN, R.J.; GREENE, A.S. Renin gene transfer restores angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in Dahl S rats. **Hypertension**, v. 37, p. 386-390, 2001 (c).

AMARAL, S.L, et al. CYP4A metabolites of arachidonic acid and VEGF are mediators of skeletal muscle angiogenesis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.284, H1528 – H1535, 2003.

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.

AMARAL, S.L. et al. Preventive effects of exercise training on dexamethasone-induced hypertension, oxidative stress and peripheral insulin resistance. **Faseb J**. v. 24, p. 982 - 987, 2010 (d).

AMARAL, S. L et al. Opposite effects of exercise and dexamethasone on skeletal muscle glucose uptake: Role of AMPK α 2 and CaMKII. **Faseb J**. v. 24, p. 806 – 810. 2010 (e).

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.

BROTMAN, D.J, et al. Effects of short-term glucocorticoids on cardiovascular biomarkers. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 6, p. 3202-3208, 2005.

BUFORD, T.W, COOKE, M.B; WILLOUGHBY, D.S. Resistance exercise-induced changes of inflammatory gene expression within human skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol**. v. 107,

p. 463-471, 2009.

BURD, N.A. Effect of a cyclooxygenase-2 inhibitor on postexercise muscle protein synthesis in humans. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 298, p. 354 – 361, 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.

CASTRO, M.R; LUTZ, D; EDELMAN, J.L. Effect of COX inhibitors on VEGF-induced retinal vascular leakage and experimental corneal and choroidal neovascularization. **Experimental Eye Research.** v. 79, p. 275-285, 2004.

CEJUDO, P. et al. Exercise training in mitochondrial myopathy: a randomized controlled trial. **Muscle & Nerve**, v. 32, n.3, p. 342-350, 2005.

CHIANG, J. et al. Honokiol protects rats against eccentric exercise-induced skeletal muscle damage by inhibiting NF- κ B induced oxidative stress and inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 610, p. 119–127, 2009.

CODERRE, L. et al. Regulation of glycogen concentration and glycogen synthase activity in skeletal muscle of insulin-resistant rats. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 464, n. 1, p. 144-50, 2007.

COIMBRA, R. et al. Is gender crucial for cardiovascular adjustments induced by exercise training in female spontaneously hypertensive rats? **Hypertension.** v. 52, p. 514-521, 2008.

CROXTALL, J.D; CHOUDHURY, Q.; FLOWER, R.J. Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signaling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. **British Journal of Pharmacology.** v. 130, p.289-298, 2000.

CROXTALL, J.D.; PAUL-CLARK M.; HAL, P.T.W.V. Differential modulation of glucocorticoid action by FK506 in A549 cells. **Biochem. J.** v. 376, p. 285-290, 2003.

DEMARZO, M.M.P. et al. Exercise reduces inflammation and cell proliferation in rat colon carcinogenesis. **Med. Sci. Sports Exerc.** v. 40, n. 4, p. 618-621, 2008.

DIONISIO, E. J. et al. Exercício físico no controle dos efeitos colaterais da dexametasona. In: XXI Congresso de Iniciação Científica da Unesp. **Anais do XXI Congresso de Iniciação**

Científica da Unesp, CD, 2009.

DIONISIO, T. J. et al. Dexamethasone negative side effects on insulin signaling is prevented by Exercise Training: role of IRS-1 and p-AKT. **Faseb Journal**. v. 24, p.806 - 810, 2010.

FARIA,C.D.C; LONGUI, C.A. Aspestos moleculares da sensibilidade aos glicocorticóides. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**; São Paulo, v.50, nº.6, 2006.

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.

FOURNIER, T.; FADOK, V.; HENSON, P.M. Tumor necrosis factor- α inversely regulates prostaglandin D₂ and Prostaglandin E₂ production in murine macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 272, n.49, p. 31065-31072, 1997.

GALVAO, D.A.; NEWTON, R.U.; TAAFFE, D.R. Anabolic responses to resistance training in older men and women: a brief review. **J Aging Phys act**, v. 13, n.3, p. 343-358, 2005.

GAVIN, T.P. et al. Nitric oxide synthase inhibition attenuates the skeletal muscle VEGF mRNA response to exercise. **J Appl Physiol**. v. 88, p.1192–1198, 2000.

GILSON, H. et al. Myostatin Gene Deletion Prevents Glucocorticoid - Induced Muscle Atrophy. **Endocrinology**. v. 148, n. 1, p. 452–460, 2007.

GIOZZET, V.A. Dexamethasone treatment in vivo counteracts the functional pancreatic islet alterations caused by malnourishment rats. **Metabolism**. v. 57, p. 617 - 624, 2008.

GUEDES, D.P. and GONÇALVES, L. A. V. V. Impacto da prática habitual de atividade física no perfil lipídico de adultos. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 51, n. 1, p. 72-78, 2007.

HA, IS. et al.. Glucocorticoid diminishes vascular endothelial growth factor and exacerbates proteinuria in rats with mesangial proliferative glomerulonephritis. **Am J Kidney Dis**, v. 39, n. 5, p. 1001-1010, 2002.

HALABY, I.A. et al. Glucocorticoid-Regulated VEGF Expression in Ischemic Skeletal Muscle. **Molecular Therapy**, v. 5, n. 3, p. 300-306, 2002.

HARRIS, R.C.; BREYER, M.D. Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. **Am J Physiol Renal Physiol**. v. 281, p. F1-F11, 2001.

HEISS, J.D. et al. Mechanism of dexamethasone suppression of brain tumor-associated vascular permeability in rats. Involvement of the glucocorticoid receptor and vascular permeability factor. **J Clin Invest**, v. 98, n. 6, p. 1400-8, 1996.

HIRASAWA, N. et al. Involvement of prostaglandins and histamine in nickel wire-induced acute inflammation in mice. **Inc. J Biomed Mater Res**. n. 93A, p. 1306 – 1311, 2010.

HOIER, B. et al. The effect of passive movement training on angiogenic factors and capillary growth in human skeletal muscle. **J Physiol**. v. 588, n.19, p. 3833 – 3845, 2010.

HORI, R. et al. Role of prostaglandin E receptor subtypes EP2 and EP4 autocrine and paracrine functions of vascular endothelial growth factor in the inner ear. **BMC Neuroscience**. v. 11, n.35, p.1-9 ,2010.

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.

HUNTER, G.R. et al. Inverse relationship between exercise economy and oxidative capacity in muscle. **Eur J Appl Physiol**, v. 94, n. 5-6, p. 558-568, 2005.

INOUE, H. et al. Regulation by PGE₂ of the production of interleukin-6, macrophage colony stimulin factor, and vascular endothelial growth factor in human synovial fibroblasts. **British Journal of Pharmacology**. v. 136, p. 287-295, 2002.

IWAI, A. et al. Down-regulation of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma cells by glucocorticoids. **Mol Cell Endocrinol**, v. 226, n. 1-2, p. 11-17, 2004.

JAIN, S. et al. Prostaglandin E₂ regulates tumor angiogenesis in prostate cancer. **Cancer Res**. v. 68, n. 19, p. 7750-7759, 2008.

JIMÉNEZ, R.J. et al. Eccentric training impairs NF-kB activation and over-expression of inflammation-related genes induced by acute eccentric exercise in the elderly. **Mechanisms of Ageing and Development**. v. 129, p. 313 – 321, 2008.

KANERVA, A. et al. Systemic Therapy for cervical cancer with potentially regulatable oncolytic adenoviruses. **PLoS One**. v. 3, n. 8, p. e2917, 2008.

KIM, Y.S et al. Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1, CXCL12) is increased in subacromial bursitis and downregulated by steroid and nonsteroidal anti-inflammatory agents. **J ORTHOP RES**. v. 24, n.8, p. 1756-1764, 2006.

KOEDAM, J.A.; SMINK.; J.J.; VAN BUUL-OFFERS, S.C. Glucocorticoids inhibit vascular endothelial growth factor expression in growth plate chondrocytes. **Mol Cell Endocrinol**, v.197, n. 1-2, p. 35-44, 2002.

KOHNO, S. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and the effects on bone remodeling during experimental tooth movement. **J Dent Res**, v. 82, n.3, p. 177-82, 2003.

LUO, C.J. et al. Dexamethasone Inhibits Tumor Necrosis Factor- α -stimulated Gastric Epithelial Cell Migration. **J Chin Med Assoc**. v. 72, n. 10, 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, p. E363-E371, 2003.

MACHEIN, M.R. et al. Differential downregulation of vascular endothelial growth factor by dexamethasone in normoxic and hypoxic rat glioma cells. **Neuropathol. Appl. Neurobiol**. V.25, p. 104-112, 1999.

MALLET, C. et al. Differential expression of VEGF receptors in adrenal atrophy induced by dexamethasone: a protective role of ACTH. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.284, n.1, p. E156-67, 2003.

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

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.

MOTA, G.R. and ZANESCO, A. Leptina, ghrelina e exercício físico. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 51, n. 1, p. 25-33, 2007.

MYERS, M.J. et al. Biomarkers of inflammation in cattle determining the effectiveness of

anti-inflammatory drugs. **J. vet. Pharmacol. Therap.** v. 33, n. 1–8, 2009.

OLFERT, I.M. et al. Skeletal muscle capillarity and angiogenic mRNA levels after exercise training in normoxia and chronic hypoxia. **J Appl Physiol.** v. 97, p. 1176-1184, 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.

PATEL, J.V. et al. Role of metabolically active hormones in the insulin resistance associated with short-term glucocorticoid treatment. **J Negat Results Biomed**, v. 5, n. 14, p. 1-5, 2006.

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.

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.

ROVEDA, F. M. D. The Effects of Exercise Training on Sympathetic Neural Activation in Advanced Heart Failure: A Randomized Controlled Trial. **JACC.** v. 42, n. 5, 2003.

SANTOS, C.L., RAFACHO, A. and 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, n. 3, p. 101-110, 2007.

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.

SILVA, G.J. et al. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v.30, n.3 Pt 2, p. 714-9, 1997.

SOLTOW, Q. A. et al. Nitric oxide regulates stretch-induced proliferation in C2C12 myoblasts. **J Muscle Res Cell Motil.** v. 31, p. 215–225, 2010.

SUDBO, J et al. COX-2 expression in striated muscle under physiological conditions. **Oral Diseases**. v. 9, n. 313 – 316, 2003.

TESTA, M. et al. Expression and activity of cyclooxygenase isoforms in skeletal muscles and myocardium of humans and rodents. **J Appl Physiol**. V. 103, p. 1412 – 1418, 2007.

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

VOGT, C.J.; SCHMID-SCHONBEIN, G.W. Microvascular endothelial cell death and rarefaction in the glucocorticoid-induced hypertensive rat. **Microcirculation**, v.8, p. 129-139, 2001.

WEINHEIMER, E.M. et al. Resistance exercise and cyclooxygenase (COX) expression in human skeletal muscle : implications for COX-inhibiting drugs and protein synthesis. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 292, p. R2241-R2248, 2007.

WILLIAMS, B. A potential role for angiotensin II-induced vascular endothelial growth factor expression in the pathogenesis of diabetic nephropaty? **Miner Electrolyte Metab**, v.24, p. 400-405, 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.

ZHENG, W. et al. Mechanisms of coronary angiogenesis in response to stretch: role of VEGF and TGF- α . **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.280, p. H909 – H917, 2001.

Aluno: Evandro José Dionísio

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Sandra Lia do Amaral