

**Universidade Federal de São Carlos**  
**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**  
**Programa interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**  
**UFSCAR/UNESP**

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO NA HIPERTENSÃO E NA  
ATROFIA MUSCULAR EM RATOS TRATADOS COM  
DEXAMETASONA**

Aluna: Naiara Araújo Herrera

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso

**São Carlos**  
**Março – 2016**

**Naiara Araújo Herrera**

**EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO NA HIPERTENSÃO E NA  
ATROFIA MUSCULAR EM RATOS TRATADOS COM  
DEXAMETASONA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como requisito para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Fisiológicas**

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso.

**São Carlos  
Março – 2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

H565e Herrera, Naiara Araújo  
Efeitos do treinamento físico na hipertensão e na atrofia muscular em ratos tratados com dexametasona / Naiara Araújo Herrera. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
75 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Glicocorticoide. 2. Exercício físico regular. 3. Sistema nervoso autônomo. 4. Microcirculação. 5. Espécies reativas de oxigênio. I. Título.

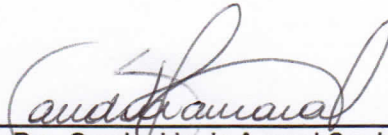


---

**Folha de Aprovação**


---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Naiara Araújo Herrera, realizada em 29/03/2016:



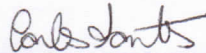
---

Profa. Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso  
UNESP



---

Prof. Dr. Anderson Saranz Zago  
UNESP



---

Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos  
USP

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre me incentivam a fazer o “algo a mais”.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, e a todos os professores e funcionários que contribuíram durante minha jornada nessa pós-graduação.

Agradeço ao suporte financeiro realizado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (PROCESSO 2014/18177-7) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

Ao Prof. Titular Carlos Ferreira dos Santos (FOB-USP), por ceder o laboratório para a realização do trabalho e ao Thiago J. Dionísio (FOB-USP) pela disponibilidade e paciência de me ensinar a técnica de PCR.

Ao Prof. André Luis Shinohara (FOB-USP) e ao Prof. Jesus Carlos Andreo (FOB-USP), por cederem o laboratório para a realização do trabalho e ao Mizael Pereira (FOB-USP) pela disponibilidade e comprometimento de me ensinar a realizar as análises morfométricas pela técnica de coloração com HE.

À prof<sup>a</sup>. Titular Lusiane Maria Bendhack (FCFRP-USP), por ceder o laboratório para a realização do trabalho e à Marcella Grando (FCFRP-USP) pela disponibilidade e atenção em auxiliar na realização da análise por citometria de fluxo.

À prof<sup>a</sup>. Cristina Antoniali Silva (FOA-UNESP), por ceder o laboratório para a realização do trabalho e, especialmente, à Jéssica Antonini Troiano (FOA-UNESP) que me ensinou e me ajudou diretamente na realização da análise por citometria de fluxo, bem como, auxiliou no entendimento dos resultados.

Aos meus amigos, que fiz nas mais diversas cidades do interior: Mariane, Karine, Lucas, Willian, Gessynger, Leandro, Jéssica, Murilo e outros que me acompanharam durante o período das disciplinas e dos experimentos, colaborando para que pudéssemos comemorar juntos o final de cada etapa.

Aos amigos do LEFEx (Aline, André, Anderson, Paula, Isley, Francine, Mayara, Leonardo, Vinicius, Danyelle, Lidiane), por todo ensinamento, ajuda, paciência, disponibilidade, conversas, risadas, discussões, churrascos e reuniões informais, que ajudaram na minha formação, tanto profissional como pessoal.

Às amigas que a cidade lanche me proporcionou (Luiza, Tanaca e Fabi) e que me apoiaram e me aguentaram em toda essa etapa. Em especial à Amanda, por toda paciência e incentivo, e por estar ao meu lado também nos momentos de fraqueza.

À minha orientadora de TCC da graduação em Educação Física na Unesp, Dr<sup>a</sup> Paula Fávoro Polastri Zago, cuja confiança em mim, possibilitou meu ingresso na pós-graduação.

Em especial, à minha orientadora e mentora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Sandra Lia do Amaral Cardoso, agradeço por ter acreditado em mim e ter me dado a oportunidade de realizar o Mestrado, um sonho que por muitas vezes pareceu tão distante. Agradeço por todos os ensinamentos, conselhos, incentivos, conversas e broncas, tudo essencial para o meu crescimento, tanto como professora/pesquisadora como pessoa; sem eles, não teria chegado até aqui. Muito obrigada.

Aos meus pais (Edna e Gilson) que sempre me apoiaram em todas as fases de minha vida, inclusive e especialmente nesses dois últimos anos. Obrigada por sempre acreditarem em mim e me amarem incondicionalmente. Sou extremamente grata pelo exemplo de vida e família que vocês me proporcionaram. Amo vocês.

Ao meu irmão, Renan, que independentemente de qualquer coisa, sempre esteve ao meu lado tanto nos momentos de alegria como nos momentos de tristeza e que sei que continuará a me apoiar em todas as etapas da vida. Amo você.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma ajudaram a tornar possível, o presente momento, que significa muito para mim.

## RESUMO

A dexametasona (DEX) é amplamente utilizada devido ao seu potente efeito anti-inflamatório, contudo seu uso crônico pode acarretar efeitos deletérios, dentre eles a hipertensão arterial (HA) e a atrofia muscular. Os mecanismos responsáveis por esses efeitos permanecem incompreendidos. O sistema nervoso, a microcirculação e o estresse oxidativo parecem estar envolvidos com a HA. O estresse oxidativo também pode ser responsável pela atrofia muscular. Por outro lado, o treinamento físico (TF) é recomendado no tratamento da HA e é considerado moderador do estresse oxidativo. O objetivo do estudo foi investigar se a HA induzida pela DEX está associada com alterações no sistema nervoso autônomo, na microcirculação e ao estresse oxidativo. Além disso, avaliar se a diminuição da PA induzida pelo TF está associada a um melhor ajuste nestes mecanismos. Ainda, investigar se a atrofia muscular também estaria envolvida com o estresse oxidativo e se o TF poderia contribuir para melhora dessa alteração. Ratos Wistar foram submetidos a um protocolo de TF ou mantidos sedentário por 8 semanas. Os animais foram tratados ou não com DEX (50µg/kg, por dia, por 14 dias) compondo 4 grupos: sedentário controle (SC), sedentário DEX (SD), treinado controle (TC) e treinado DEX (TD). Foram analisados peso corporal (PC), pressão arterial em repouso, balanço autonômico para o coração e atividade simpática para os vasos. A aorta foi coletada para avaliação do estresse oxidativo e os músculos tibial anterior (TA) e sóleo (SOL) coletados para realização das análises histológicas na microcirculação e avaliações gênicas e proteicas da gp91phox, p47phox, SOD-1, SOD-2 e CAT. A DEX provocou redução do PC (-29,1g), aumento da PA (+12,1%), atrofia muscular no TA (-8,2%), aumento das ondas de baixa frequência para o coração (+58,5%) e para os vasos (+96,6%), diminuição das ondas de alta frequência para o coração (-12,0%), redução da densidade capilar e da razão capilar fibra nos músculos TA (respectivamente, -21,9%, -11,1%) e SOL (respectivamente -25,9%, -22,2%). O TF atenuou o aumento da PA (-10,0%), o aumento das ondas de baixa frequência para o coração (-21,5%) e para os vasos (-8,4%) e a diminuição das ondas de alta frequência para o coração (+8,4%), além de prevenir a redução da densidade capilar e da razão capilar fibra, tanto no TA (respectivamente, +46,0%, +31,6%) como no SOL (respectivamente, +44,4%, +37,5%) e aumentar a produção protéica da SOD-2 e CAT no TA (respectivamente, +37,4%, +20,9%) e no SOL (respectivamente, +15,4%, +18,0%). Assim, podemos concluir que a HA induzida por DEX pode estar relacionada tanto com alterações no sistema nervoso autônomo para o coração e no sistema simpático para os vasos, como com a rarefação encontrada na microcirculação e que o TF foi capaz de atenuar esse aumento da PA devido a uma melhora no balanço autonômico para o coração e a prevenção da rarefação na microcirculação. O aumento da capacidade antioxidante induzido pelo TF independente da atenuação da atrofia muscular sugere que o estresse oxidativo parece não influenciar a atrofia muscular induzida pela DEX.

**Palavras chaves:** Glicocorticoide, exercício físico regular, sistema nervoso autônomo, microcirculação e espécies reativas de oxigênio.



## ABSTRACT

Dexamethasone (DEX) is widely used due to its potent anti-inflammatory effect, although its chronic use may cause unwanted effects, including arterial hypertension (H) and muscle atrophy. The mechanisms responsible for these effects remain unclear. Nervous system, microcirculation and oxidative stress may be involved in H. In addition, oxidative stress may also be responsible for muscle atrophy. On the other hand, exercise training (T) is recommended for H treatment and it is an oxidative stress modulator. The aim of this study was to investigate if DEX-induced H is associated with changes in the autonomic nervous system, microcirculation and oxidative stress. Moreover, it evaluated if arterial pressure (AP) reduction induced by T is associated with a better balance of these mechanisms. Still, it investigated if muscle atrophy was also involved with oxidative stress and if T could improve this response. Rats were submitted to T for 8 weeks or kept sedentary and then treated or not with DEX (50 $\mu$ g/kg/day for 14 days), composing four groups: sedentary control (SC), sedentary DEX (SD), trained control (TC) and trained DEX (TD). Body weight (BW), basal AP, autonomic balance to the heart and sympathetic nerve activity to the vessels were analyzed. Aorta was collected for evaluation of oxidative stress and tibialis anterior (TA) and soleus (SOL) muscles were collected for microcirculation histological analysis and for gene and protein evaluations of gp91phox, p47phox, SOD-1, SOD-2 and CAT. DEX decreased BW (-29.1g), increased AP (+12.1%), TA muscle atrophy (-8.2%), increased low-frequency waves to the heart (+58.5%) and vessels (+96.6%), decreased high-frequency waves to the heart (-12.0%), reduced capillary density and capillary-fiber-ratio (C:F ratio) in TA (respectively -21.9%, -11.1%) and SOL (respectively -25.9%, -22.2%) muscles. In contrast, T mitigated AP increase (-10.0%), attenuated low-frequency waves increase to the heart (-21.5%) and vessels (-8.4%) and also high-frequency waves decrease to the heart (+8.4%). Moreover, T prevented capillary density and C:F ratio reductions in TA (respectively, +46.0% +31.6%) and SOL (respectively, +44.4% +37.5%) muscles and increased SOD-2 and CAT protein level in TA (respectively +37.4%, +20.9%) and SOL (respectively +15.4%, +18.0%) muscles. The results allow us to suggest that DEX-induced H may be associated with changes in sympathetic nervous system to the heart and vessels, parasympathetic nervous system to the heart and also microcirculation rarefaction. In the other hand, T was able to mitigate AP increase due to autonomic balance improvement and rarefaction prevention. Since T increased rat's antioxidant capacity independent of attenuation of muscle atrophy, we may suggest that oxidative stress is not involved in DEX-induced muscle atrophy.

**Key words:** Glucocorticoids, regular exercise, autonomic nervous system, microcirculation and reactive oxygen species.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Possíveis mecanismos responsáveis pela formação das espécies reativas de oxigênio (vermelho) e ações das enzimas antioxidantes (azul). SOD: Superóxido Dismutase, CAT: Catalase, GPx: Glutathione Peroxidase, NADPH Oxidase: Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato oxidase.....18
- Figura 2:** linha do tempo do protocolo experimental, peso corporal (PC), teste máximo (Teste max), pressão arterial (PA).....27
- Figura 3:** Delta da capacidade física máxima, comparando os valores após e antes do período de treinamento físico dos ratos sedentários (n=38) e treinados (n=38). Significância: + vs sedentários  $p < 0,05$ .....35
- Figura 4:** Delta do peso corporal durante o período de treinamento físico na esteira nos animais sedentários (n=38) e treinados (n=38). Significância: + vs sedentário;  $p < 0,05$ .....36
- Figura 5:** Delta do peso corporal durante o período de tratamento com dexametasona nos grupos: sedentário controle (n=18), sedentário dexametasona (n=20), treinado controle (n=19) e treinado dexametasona (n=19). Significância: \* vs controle, + vs sedentário;  $p < 0,05$ .....36
- Figura 6:** Valores de pressão arterial sistólica (Painel A), diastólica (Painel B) e média (Painel C) dos grupos sedentários controle (SC, n=11), sedentário dexametasona (SD, n=10), treinado controle (TC, n=11) e treinado dexametasona (TD, n=9). Significância: \* vs controle, + vs sedentário;  $p < 0,05$ .....38
- Figura 7:** Valores de frequência cardíaca dos grupos sedentários controle (SC, n=12), sedentário dexametasona (SD, n=12), treinado controle (TC, n=13) e treinado dexametasona (TD, n=12). Significância: \* vs controle, + vs sedentário;  $p < 0,05$ .....39
- Figura 8:** Valores das ondas de Baixa frequência (Painel A), Alta frequência (Painel B), Baixa frequência/Alta frequência (Painel C) para o coração e valores das ondas de Baixa frequência (Painel D) para os vasos dos grupos sedentários controle (SC, n=7), sedentário dexametasona (SD, n=8), treinado controle (TC, n=7) e treinado dexametasona (TD, n=10). Significância: \* vs controle, + vs sedentário;  $p < 0,05$ .....41
- Figura 9:** Imagens de cortes transversais do músculo TA tirados de um animal de cada grupo corados com hematoxilina-eosina. Representando os grupos sedentário controle (Painel A), sedentário dexametasona (Painel B), treinado controle (Painel C) e treinado dexametasona (Painel D). Setas indicam os capilares. Barra 100 $\mu$ m.....42

**Figura 10:** Imagens de cortes transversais do músculo SOL tirados de um animal de cada grupo corados com hematoxilina-eosina. Representando os grupos sedentário controle (Painel A), sedentário dexametasona (Painel B), treinado controle (Painel C) e treinado dexametasona (Painel D). Setas indicam os capilares. Barra 100µm.....42

**Figura 11:** Valores da densidade capilar (Painel A), razão capilar fibra (Painel B), correlação entre a densidade capilar e a PAM (Painel C) e área de secção transversa (Painel D) no músculo TA dos grupos sedentários controle (SC, n=7), sedentário dexametasona (SD, n=8), treinado controle (TC, n=7) e treinado dexametasona (TD, n=8). Significância: \* vs controle, + vs sedentário; p<0,05.....44

**Figura 12:** Valores da densidade capilar (Painel A), razão capilar fibra (Painel B), correlação entre a densidade capilar e a PAM (Painel C) e área de secção transversa (Painel D) no músculo SOL dos grupos sedentários controle (SC, n=7), sedentário dexametasona (SD, n=9), treinado controle (TC, n=9) e treinado dexametasona (TD, n=8). Significância: \* vs controle, + vs sedentário; p<0,05.....45

**Figura 13:** Valores da intensidade ao DHE dos grupos sedentários controle (SC, n=7), sedentário dexametasona (SD, n=7), treinado controle (TC, n=7) e treinado dexametasona (TD, n=7). Significância: \* vs controle, + vs sedentário; p<0,05.....47

**Figura 14:** mRNA da SOD-1 (Painel A), SOD-2 (Painel B), CAT (Painel C), gp91phox (Painel D) e p47phox (Painel E) normalizado por GAPDH no músculo TA dos grupos sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD). O número de ratos usados para a expressão gênica foi de 9 a 16 por grupo. Significância: \* vs controle, + vs sedentário; p<0,05.....48

**Figura 15:** mRNA da SOD-1 (Painel A), SOD-2 (Painel B), CAT (Painel C), gp91phox (Painel D) e p47phox (Painel E) normalizado por GAPDH no músculo SOL dos grupos sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD). O número de ratos usados para a expressão gênica foi de 9 a 17 por grupo. Significância: \* vs controle, + vs sedentário; p<0,05.....49

**Figura 16:** Valores das análises quantitativas da produção das proteínas SOD-1 (Painel A), SOD-2 (Painel B), CAT (Painel C), gp91phox (Painel D) e p47phox (Painel E) normalizado por GAPDH no músculo TA dos grupos sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD). O número de ratos usados para a produção protéica foi de 5 a 10 por grupo e os resultados são expressos como % do grupo controle (SC). Significância: \* vs controle, + vs sedentário; p<0,05.....50

**Figura 17:** Valores das análises quantitativas da produção das proteínas SOD-1 (Painel A), SOD-2 (Painel B), CAT (Painel C), gp91phox (Painel D) e p47phox (Painel E) normalizado por GAPDH no músculo SOL dos grupos sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD). O

número de ratos usados para a produção protéica foi de 6 a 10 por grupo e os resultados são expressos como % do grupo controle (SC). Significância: \* vs controle, + vs sedentário;  $p < 0,05$ .....52

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1:** Comparação dos valores de massa muscular e glândula adrenal normalizados pela tíbia entre os grupos SC, SD, TC e TD.....40

**Tabela 2:** Comparação dos valores de diâmetro externo, diâmetro interno, espessura e razão parede luz das arteríolas entre os grupos SC, SD, TC e TD do músculo TA.....44

**Tabela 3:** Comparação dos valores de diâmetro externo, diâmetro interno, espessura e razão parede luz das arteríolas entre os grupos SC, SD, TC e TD do músculo SOL.....46

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico

AF: Alta frequência

AKT: Treonina\serina tirosina quinase.

ANG: Angiotensina

ANOVA: Variância de variância

AST: Área de secção transversa

AT1: Receptor de ANG II

ATP: Trifosfato de adenosina

BF: Baixa frequência

BH4: Tetrahydrobiopterina

CAT: Catalase

CEUA: Comitê de ética no uso de animais

cGMP: Monofosfato de guanosina cíclico

COX: ciclooxigenases

CRH: Hormônio corticotropina

DEX: Dexametasona

DHE: Dihidroetidina

EDRF: Fator de relaxamento derivado do endotélio

EPM: Erro padrão da média

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FC: Frequência cardíaca

FHL: Flexor longo do hálux

FOXO: Família de proteínas sensoras das vias de sinalização da insulina

GPx: Glutathione peroxidase

HA: hipertensão arterial

HE: Hematoxilina-eosina

IF: Intensidade de Fluorescência

IGF-I: Fator de crescimento semelhante à insulina 1

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

mTOR: Proteína alvo da rapamicina em mamíferos.

muRF-1: Muscle Ringer Finger Protein 1

NAPDH oxidase: Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato oxidase

NO: Óxido nítrico  
NOS: Óxido nítrico sintase  
NTS: Núcleo do trato solitário  
 $O_2^-$ : Ânion superóxido  
 $ONOO^-$ : Ânion peroxinitrito  
p70S6K: Proteína Ribossomal S6 quinase  
PA: Pressão arterial  
PAD: Pressão arterial diastólica  
PAM: Pressão arterial média  
PAS: Pressão arterial sistólica  
PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinase  
PIC: Coquetel inibidor de proteases  
PCR: Reação de cadeia polimerase  
PKC: Proteína cinase dependente de GMP  
PVN: Núcleo paraventricular  
SC: Sedentário controle  
SD: Sedentário Dexa  
SHR: Ratos espontaneamente hipertensos  
SNA: Sistema nervoso autônomo  
SNC: Sistema nervoso central  
SOD: Superóxido dismutase  
SOL: Sólido  
SRA: Sistema renina angiotensina  
TA: Tibial anterior  
TC: Treinado controle  
TD: Treinado Dexa  
TEM: Teste de esforço máximo  
TF: Treinamento físico  
UPS: Sistema Ubiquitina proteassoma  
USP: Universidade de São Paulo  
VE: Ventrículo esquerdo  
VEGF: Fator de crescimento endotelial de vasos

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
1.1 Glicocorticóides, dexametasona e seus efeitos .....	15
1.2 Dexametasona e hipertensão arterial .....	16
1.3 Dexametasona e atrofia muscular .....	21
1.4 Treinamento físico, hipertensão arterial e atrofia muscular.....	22
2 OBJETIVO .....	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
3.1 Capacidade física máxima dos animais .....	26
3.2 Grupos experimentais .....	26
3.3 Protocolo de treinamento físico .....	27
3.4 Tratamento farmacológico .....	27
3.5 Determinação da pressão arterial direta e análise espectral.....	27
3.5.1 Confecção de cânulas.....	27
3.5.2 Registro de PA e frequência cardíaca .....	28
3.5.3 Análise espectral .....	28
3.6 Citometria de fluxo .....	29
3.6.1 Isolamento de células endoteliais de aorta de ratos .....	29
3.6.2 Quantificação da concentração de Espécies Reativas de Oxigênio .....	29
3.7 Retirada dos músculos .....	29
3.7.1 Extração de RNA total.....	30
3.7.2 Quantificação e qualificação do DNA .....	30
3.7.3 Tratamento do RNA total com DNase e transcrição reversa.....	30
3.7.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa .....	31
3.7.5 Protocolo de dosagem de proteína .....	32
3.7.6 Procedimento de Western Blotting .....	32
3.7.7 Análises morfométricas .....	33
3.8 Métodos estatísticos .....	34
4 RESULTADOS .....	35
5 DISCUSSÃO .....	52
6 CONCLUSÃO .....	63
7 REFERÊNCIAS.....	64
ANEXO 1 .....	75



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Glicocorticóides, dexametasona e seus efeitos

Os glicocorticóides são hormônios esteróides secretados pela zona cortical da glândula supra-renal. Sua produção e secreção são estimuladas como resposta a condições específicas a que o organismo é exposto, como estresse, hipoglicemia, infecções, cirurgia, choque, trauma e exercício físico (ANTI et al., 2008). Nessas situações, impulsos nervosos são enviados para o sistema nervoso central (SNC), que estimula neurônios localizados no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo a liberar o hormônio corticotrofina (CRH). Esse hormônio, através do sistema porta-hipofisário, estimula a adenohipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (GUYTON; HALL, 2011). Transportado pela corrente sanguínea até as glândulas supra-renais, esse hormônio, se liga aos seus receptores específicos na membrana do córtex das glândulas supra-adrenais e estimula a síntese e secreção dos glicocorticóides (ELIAS et al., 2008).

Dentre os glicocorticóides, o principal é o cortisol (corticosterona, em roedores), que é transportado pelo organismo por proteínas carreadoras e que atua em todos os tecidos e órgãos (KIRWAN, 1998). Por possuir característica lipofílica, esse hormônio ultrapassa a bicamada lipídica da membrana e se liga ao receptor específico no citoplasma, por sua vez, esse complexo ligante-receptor adentra ao núcleo da célula controlando a expressão de genes e atuando como fator de transcrição (DE KLOET et al., 1993; WRIGHT et al., 1993). As respostas fisiológicas estimuladas pelo cortisol estão relacionadas à mobilização de proteínas, carboidratos e lipídeos, bem como, a uma ação anti-inflamatória (ELIAS et al., 2008; GUYTON; HALL, 2011).

Por conta dessa característica anti-inflamatória, diversos glicocorticóides sintéticos foram desenvolvidos pela indústria farmacêutica, dentre eles, a Dexametasona (DEX). Esse fármaco é amplamente utilizado no tratamento de doenças como asma, febre reumática, artrite, doenças auto-imunes, além da sua menor utilização como antiemético e contra delírios pós cirúrgicos (CARDOSO et al., 2013; MARDANI; BIGDELIAN, 2013; REBEYROL et al., 2012).

Contudo, o uso crônico da DEX pode acarretar diversos efeitos deletérios, como alterações no metabolismo de lipídios e glicose, perda de peso corporal, atrofia muscular e aumento da pressão arterial (PA) (BAREL et al., 2010; DIONISIO et al., 2014; GIOZZET et al., 2008; KRUG et al., 2015; MACEDO et al., 2014; MACEDO

et al., 2016; MONDO et al., 2006; RAFACHO et al., 2007; SCHNEITER; TAPPY, 1998; WEINSTEIN et al., 1998).

## 1.2 Dexametasona e hipertensão arterial

O aumento da PA provocado pelo tratamento com a DEX já foi evidenciado tanto em animais (BAREL et al., 2010; DODIC et al., 1999; MONDO et al., 2006; ONG et al., 2013) como em humanos (BROTMAN et al., 2005; SUDHIR et al., 1989). Entretanto os mecanismos responsáveis por esse efeito deletério encontram-se inconclusivos.

O estudo de Tonolo et al. (1988) mostra que possivelmente o aumento da PA induzida pela DEX possa estar relacionado com a diminuição do hormônio responsável pela natriurese, diurese e vasodilatação, hormônio denominado de peptídeo atrial natriurético, apesar desta redução não ser consenso na literatura (GUARINO; SHIMA; PURI, 2001; LIU et al., 2010).

Por outro lado, outros estudos mostram que talvez o sistema renina angiotensina (SRA) seja o responsável por esse efeito deletério da DEX, uma vez que, já foi evidenciado tanto aumento dos receptores AT1 de angiotensina (ANG) II (vasoconstritores)(SHELAT; FLANAGAN-CATO; FLUHARTY, 1999), como o aumento da atividade da ANG II (ROGHAIR et al., 2008). Embora um estudo de nosso laboratório já tenha demonstrado que o aumento da PA provocada pelo tratamento com DEX por 10 dias (1mg/kg por dia) parece não estar envolvido com o SRA, uma vez que não foi observado aumento nem da expressão gênica nem da produção proteica dos componentes do SRA (CONSTANTINO, 2014). Além disso, o tratamento prévio com losartan, um inibidor dos receptores AT1 de ANG II, não atenuou o aumento de PA induzida pela DEX nesta dosagem de 1mg/kg (CONSTANTINO, 2014).

Outro mecanismo também indicado como causa da hipertensão arterial (HA) provocada pela DEX é a diminuição da óxido nítrico sintase (NOS), enzima responsável pela formação do óxido nítrico (NO), gás que está diretamente relacionado com a vasodilatação do endotélio vascular, suprimindo assim sua formação (SCHAFER et al., 2005; SEVERINO et al., 2002).

No entanto, tem sido demonstrado que tanto a suplementação com L-arginina (precursor da enzima NOS) tanto com a sepiapterina (substância transformada pelo organismo em cofator tetrahidrobiopterina – BH4, que regula a enzima NOS) ou mesmo

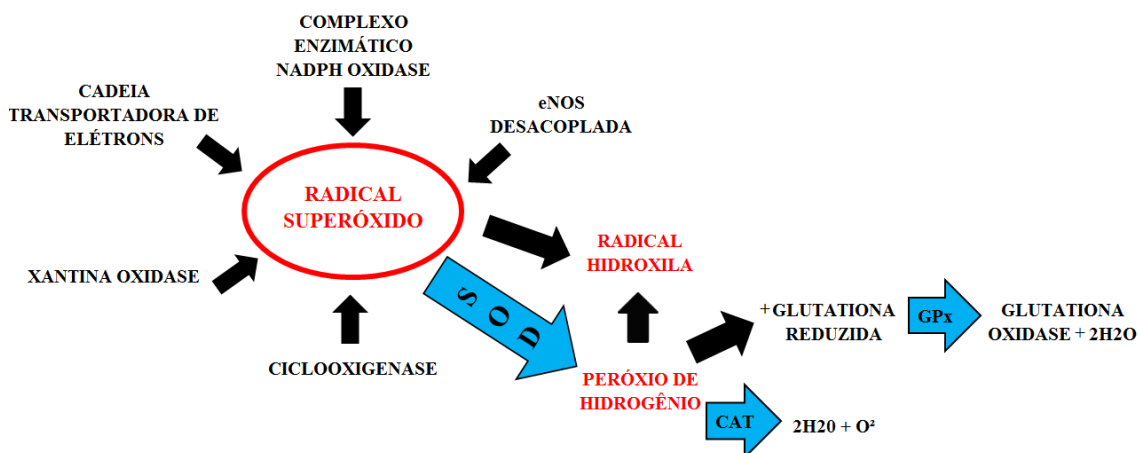
a suplementação com o próprio BH4 não foram eficazes em prevenir o aumento da PA induzida pela DEX, contrariando a hipótese de que a diminuição da enzima NOS fosse a principal responsável pela diminuição da produção do NO, e assim, pelo aumento da PA (HU et al., 2006; MIAO et al., 2007; THIDA et al., 2010).

Além desses mecanismos, alterações no sistema nervoso também parecem contribuir para o aumento da PA induzida pela DEX, haja vista, já ter sido evidenciado que injeções bilaterais de DEX no núcleo do trato solitário (NTS) provocaram aumento tanto da PA como da frequência cardíaca (FC) (WANG; OU; CHAN, 2005). Além disso, que a HA desenvolvida em ovelhas que foram expostas a DEX no período pré natal, parece estar relacionada a alterações na sensibilidade barorreflexa (DODIC et al., 1999), apesar de não se ter informações sobre esse efeito em animais expostos a DEX na fase adulta. Ainda, resultados recentes de nosso laboratório mostram que o tratamento com DEX (1mg/kg) por 1 e 5 dias parece provocar alterações no sistema nervoso autônomo, elevando a atividade nervosa simpática e diminuindo a atividade nervosa parassimpática para o coração (DUCHATSCH, 2015). Entretanto, até o momento, a contribuição do sistema nervoso no aumento da PA induzida por DEX permanece inconclusiva.

Alterações estruturais na microcirculação também podem estar envolvidas no aumento da PA induzida por DEX. O aumento da resistência periférica vascular é um dos principais mecanismos implicados na gênese e na manutenção da HA (AMARAL; ZORN; MICHELINI, 2000) e tem sido caracterizado tanto pelo aumento da razão parede-luz das arteríolas localizadas na musculatura periférica (AMARAL et al., 2000) como pela rarefação na microcirculação (AMARAL et al., 2000; FERNANDES et al., 2012). A redução do número de vasos já foi demonstrada após tratamento com DEX no músculo cremaster (VOGT; SCHMID-SCHONBEIN, 2001). Assim, apesar da influência das alterações na microcirculação estarem bem estabelecidas em outros modelos de HA, sua influência no aumento da PA induzida pela DEX permanece incerto.

Mais recentemente, o estresse oxidativo vem sendo considerado um potente mecanismo responsável pelo aumento da PA provocada pela DEX (MONDO et al., 2006; ONG; WHITWORTH, 2011; ROGHAIR et al., 2008). Neste sentido, quantidades elevadas de radicais livres, como os ânions superóxidos ( $O_2^-$ ) poderiam oxidar o NO e reduzir sua biodisponibilidade, bloqueando sua característica vasodilatadora.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) e sua remoção pelas enzimas antioxidantes, podendo estar associado tanto ao aumento da produção como a diminuição da remoção (FINKEL; HOLBROOK, 2000).



**Figura 1:** Possíveis mecanismos responsáveis pela formação das espécies reativas de oxigênio (vermelho) e ações das enzimas antioxidantes (azul). SOD: Superóxido Dismutase, CAT: Catalase, GPx: Glutationa Peroxidase, NADPH Oxidase: Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato oxidase.

Como observado na Figura 1, as EROs, como radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil são formadas a partir da redução do oxigênio por diversos mecanismos. Por exemplo, na mitocôndria, mais especificamente na cadeia transportadora de elétrons, 2 a 5% do oxigênio gerado são reduzidos a radicais superóxidos, ou pela xantina oxidase, enzima que converte hipoxantina e oxigênio em radicais superóxidos e peróxido de hidrogênio, ou mesmo pela NOS desacoplada, provocada pela diminuição dos níveis de BH4 (responsável pela regulação da enzima NOS) e que promove diminuição da produção de NOS e aumento na produção de radicais superóxidos. Além desses, a produção de radicais livres também pode ocorrer pela atividade da cicloxigenase (COX), ou também pelo complexo enzimático NADPH oxidase (Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato oxidase), que transforma oxigênio em radicais superóxidos, principalmente pela presença de ANG II, respostas inflamatórias, entre outros.

Já o sistema antioxidante, também ilustrado na Figura 1, tem como objetivo a prevenção e o controle dessa formação de EROs. Este sistema está dividido em dois grupos: 1/ sistema de defesa enzimático compreendido pela enzima superóxido

dismutase (SOD), que transforma os ânions superóxidos em ânions peróxido de hidrogênio; a catalase (CAT), que transforma ânions peróxido de hidrogênio em água e oxigênio e a glutathione peroxidase (GPx), que é uma enzima responsável pela conversão da glutathione reduzida e ânions peróxido de hidrogênio em glutathione oxidada e água e 2/ sistema de defesa não-enzimático, que está associado a compostos de origem dietética (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

Em condições fisiológicas, as EROs participam como mediadoras em várias reações químicas, como geração de trifosfato de adenosina (ATP), ativação de genes, até mesmo mecanismos de defesa contra infecções, entretanto, em altas concentrações, como é denominado de estresse oxidativo, as EROs reagem com as biomoléculas, provocando várias disfunções metabólicas pela oxidação de proteínas e lipídios, sendo assim considerada a causa de diversas patologias como diabetes, atrofia muscular, aterosclerose, trombose, HA, entre outras (CAI; HARRISON, 2000; FINKEL; HOLBROOK, 2000).

Com ênfase na correlação entre o estresse oxidativo e a HA, os estudos apontam para a diminuição da biodisponibilidade do NO como o fator determinante (MONDO et al., 2006; ONG; WHITWORTH, 2011; ONG et al., 2009; TOUYZ, 2004).

O óxido nítrico, antigamente denominado de fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), é sintetizado no endotélio vascular a partir da L-arginina pela ação da enzima NOS. Além de ser responsável por diversas respostas fisiológicas como diminuição da agregação plaquetária, diminuição da produção de endotelina, diminuição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), diminuição da expressão de moléculas de adesão, ele também é responsável pela vasodilatação (GALLEY; WEBSTER, 2004).

Por ser um gás, o NO transporta-se do endotélio para a musculatura lisa onde ativa a enzima guanilatociclase e induz à formação de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) através do ATP, que, por sua vez, irá ativar a proteína cinase dependente de monofosfato de guanosina (PKC), acarretando na diminuição da concentração de íons cálcio no músculo liso e de sua união com a calmodulina, o que reduz a contração da musculatura, provocando vasodilatação (GALLEY; WEBSTER, 2004).

Entretanto, em condições onde o estresse oxidativo é estabelecido, o radical superóxido, que está acumulado no organismo, oxida o NO formando peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), o que contribui diretamente para reduzir a biodisponibilidade de NO,

resposta esta que pode estar diretamente relacionada ao aumento da PA (ONG; WHITWORTH, 2011; RUSH; FORD, 2007). Assim, uma vez que, o tratamento crônico com DEX tem mostrado induzir o estresse oxidativo em ratos (MONDO et al., 2006; ONG et al., 2013) alguns autores estudaram concomitantemente ao tratamento com DEX, a suplementação com substâncias antioxidantes, tais como tempol, ácido fólico, atorvastatina e ácido alfa-lipóico, com o objetivo de diminuir os níveis de EROs no organismo e observaram uma prevenção do aumento de PA induzida pela DEX (MIAO et al., 2007; MONDO et al., 2006; ONG et al., 2013; ZHANG et al., 2004), reafirmando o fato de que o estresse oxidativo poderia ser o principal responsável pela HA induzida por DEX.

Com isso, seria importante determinar se esse estresse oxidativo estaria vinculado ao aumento da produção de EROs ou a diminuição de sua remoção pelas enzimas antioxidantes, a fim de melhor entender o mecanismo pelo qual a DEX estaria provocando o aumento da PA.

Neste sentido, Ong et al. (2007) bloquearam a atividade da enzima xantina oxidase, que transforma hipoxantina e oxigênio em radicais superóxidos e peróxido de hidrogênio com a utilização do composto allopurinol. Esses autores observaram que o bloqueio não provocou prevenção do aumento de PA em ratos tratados com DEX, o que leva a crer que a geração de EROs pela atividade da xantina oxidase parece não ser a principal responsável pelo aumento de PA observado após tratamento com DEX. Da mesma forma que o bloqueio da cicloxigenase com aspirina, também não preveniu o aumento de PA em ratos tratados com DEX (ZHANG; MIAO; WHITWORTH, 2007).

Com o intuito de verificar a influência da NOS desacoplada na formação de radicais livres, alguns estudiosos suplementaram os ratos tratados com DEX, tanto com BH4 como com sepiapterina, que é posteriormente transformada em BH4 pelo organismo, a fim de suprimir a diminuição de BH4, que acarreta em NOS desacoplada e formação de radicais superóxido, entretanto, nenhuma das condições foi eficaz em reverter o aumento da PA induzida pela DEX (MIAO et al., 2007; THIDA et al., 2010).

Ainda, Ong et al. (2013) suplementaram ratos previamente tratados com DEX, com ácido alfa-lipóico, um antioxidante com propriedades inibitórias na produção de superóxido pela mitocôndria e observaram que a suplementação foi capaz de prevenir o aumento de PA, entretanto, sem alterar a produção mitocondrial de radicais superóxidos, sugerindo assim, que a produção mitocondrial de EROs não estava diretamente envolvida na hipertensão induzida pela DEX.

Entretanto, Hu et al. (2006) ao tratar ratos com DEX e apocinina, que é um bloqueador do complexo enzimático NADPH oxidase, que está localizado na membrana das células e é responsável pela formação de EROs, observaram uma prevenção do aumento da PA provocada pela DEX, indicando que possivelmente a DEX aumente a produção de EROs por esse complexo enzimático, o que poderia estar determinando o estresse oxidativo e conseqüentemente o aumento da PA.

Contudo, além do aumento na produção de EROs, o estresse oxidativo verificado no tratamento com DEX também poderia estar relacionado com a redução da remoção das EROs pelas enzimas antioxidantes. Somente alguns estudos investigaram essa influência e seus resultados são conflitantes, uma vez que, o estudo de Turgay et al. (2012) observou diminuição da atividade da enzima CAT enquanto que Safaeian e Zabolian (2014) verificaram aumento da capacidade antioxidante após o tratamento com a DEX.

Assim, dentre os diversos mecanismos que são apontados como responsáveis pelo aumento da PA induzida por DEX sugere-se que alterações tanto no sistema nervoso como na microcirculação, bem como, a redução da biodisponibilidade de NO provocada pelo estresse oxidativo estejam diretamente relacionadas a esse efeito deletério da DEX, no entanto, os resultados ainda permanecem incertos e/ou conflitantes, sendo necessária uma melhor investigação da influência desses mecanismos no HA induzida por DEX.

### **1.3 Dexametasona e atrofia muscular**

Além da HA, diversos estudos também têm mostrado que o tratamento crônico com DEX acarreta a redução do peso corporal dos animais (BAREL et al., 2010; DIONISIO et al., 2014; MONDO et al., 2006; TONOLO et al., 1988). Efeito deletério esse que tem sido justificado tanto pela menor ingestão alimentar (KRUG et al., 2015) associada a alterações nas adipocinas grelina e leptina, que são responsáveis, respectivamente, pela fome e pela saciedade (TULIPANO et al., 2007) como pela atrofia muscular, outro efeito colateral verificado no tratamento com a DEX (KRUG et al., 2015; MACEDO et al., 2014).

A homeostase do músculo esquelético é mantida pelo balanço entre proteínas hipertróficas como o IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina 1), PI3K (Fosfatidilinositol 3 quinase), a AKT (treonina\serina tirosina quinase), mTOR (Proteína

alvo da rapamicina de mamíferos) e a proteína p70S6K (Ribossomal S6 quinase) e as proteínas atroficas como a miostatina (diferenciação do fator-8 do crescimento), família FOXO (Forkead transcription factors), a Atrogina-1 e MuRF-1 (Muscle Ringer Finger Protein 1)(LANGEN et al., 2013; LEGER et al., 2006). Sendo essas duas últimas, proteínas atroficas diretamente envolvidas na ativação do sistema Ubiquitina-proteassoma (UPS), principal regulador do catabolismo protéico (COMBARET et al., 2004; GILSON et al., 2007).

A atrofia muscular é determinada pelo desbalanço entre essas proteínas, podendo ser desencadeada tanto pelo aumento das proteínas atroficas (MA et al., 2003) como pela diminuição das proteínas hipertróficas (LEWIS et al., 2003) ou mesmo pelos dois mecanismos (ADAMS, G. R. et al., 2007).

Além do estresse oxidativo estar associado a HA, ele também pode ser um dos possíveis mecanismos envolvidos nesse desbalanço de proteínas hipertróficas e atroficas, haja vista já ter sido desmonstrado no estudo de Bechara (2012) que a atrofia muscular em animais com insuficiência cardíaca parece estar relacionada ao estresse oxidativo. E ainda, que essa alta concentração de EROs, pelo menos em parte, pode ser devido a maior ativação do complexo enzimático NADPH oxidase. Tem sido mostrado também que altas concentrações de EROs parecem ser capazes de ativar a proteína FOXO, provocando a ativação de dois ligantes específicos do UPS, a Atrogina-1 e a MuRF-1(STEINBACHER; ECKL, 2015).

Com relação a atrofia muscular induzida por DEX, estudos recentes de nosso laboratório têm mostrado que a atrofia tanto no músculo tibial anterior (TA) como no músculo flexor longo do hálux (FHL) provocadas pelo tratamento com DEX (500 µg/kg) por 10 dias estão associadas ao aumento da proteína atrofica MuRF-1 (KRUG et al., 2015; MACEDO et al., 2014). Resultados esses que corroboram com o estudo de Nicastro et al. (2012) que ao investigar os efeitos do tratamento com DEX (5mg/kg/dia) por 7 dias no músculo plantar de ratos, observaram atrofia muscular acompanhada do aumento da proteína MuRF-1. Contudo, até o momento, nada se sabe sobre a influência do estresse oxidativo na atrofia muscular induzida pelo tratamento com DEX.

#### **1.4 Treinamento físico, hipertensão arterial e atrofia muscular**

Atualmente, o treinamento físico (TF) tem sido amplamente utilizado como tratamento não farmacológico para hipertensos, principalmente os programas de



exercícios de baixa a moderada intensidades (MANCIA et al., 2013; PESCATELLO et al., 2004).

Os mecanismos que promovem a redução da PA por meio do TF são variados, entre eles pode-se citar mecanismos relacionados ao sistema nervoso como redução significativa da atividade nervosa simpática (CAVALCANTI et al., 2009; MARTINEZ et al., 2011) e melhora do controle autonômico para o coração (BURGI et al., 2011; HIGA-TANIGUCHI et al., 2007). Esses mecanismos estão associados a adaptações crônicas do organismo por meio da ativação regular dos mecanorreceptores e metaborreceptores. Aos quais, durante a sessão de exercício, são ativados por meio das contrações musculares e dos metabólitos locais e enviam sinais aferentes para o comando central da PA auxiliando no aumento da FC e da PA durante o exercício a fim de suprir a necessidade metabólica para a realização do mesmo (GALLAGHER et al., 2001; KAUFMAN, 2012; MICHELINI et al., 2015). No entanto, quando sua ativação é realizada de forma regular (treinamento físico) é capaz de auxiliar na redução da PA de hipertensos por meio de ajustes no comando central da PA (MIZUNO et al., 2015), haja vista, que esse mecanismo parece estar alterado em modelos de HA auxiliando no aumento da PA (SMITH et al., 2015).

Dentre os mecanismos periféricos, pode-se citar as alterações na microcirculação que auxiliam na regulação da resistência periférica vascular. Durante as sessões de exercício físico, a redução da pressão parcial de oxigênio e o shear stress (estresse de cisalhamento) atuam como estímulos para as células endoteliais aumentarem a expressão do fator de crescimento endotelial de vasos (VEGF). Tem sido demonstrado que esta proteína é responsável pelo balanço entre a apoptose e a angiogênese, ou seja, quando aumentada acarreta tanto a inibição da cascata que promove apoptose como a estimulação da angiogênese, proporcionando a prevenção da redução do número de vasos que é uma resposta estabelecida na hipertensão (AMARAL et al., 2001; AMARAL et al., 2008; AMARAL et al., 2000; FERNANDES et al., 2012).

Além dessas adaptações, o TF também pode auxiliar na redução da PA de hipertensos por meio de sua influência na produção e remoção das EROs. Visto que, apesar do fato de que durante a sessão do exercício físico ocorra o aumento na produção EROs (COOPER et al., 2002; DAVIES et al., 1982), há evidências que ocorram adaptações crônicas do organismo para proteger os tecidos do estresse oxidativo. Esses ajustes podem ocorrer tanto no sistema antioxidante, com o aumento da atividade das enzimas antioxidantes, tornando-as mais eficazes na remoção das EROs, como no

sistema pró oxidante, reduzindo a atividade do complexo enzimático NADPH oxidase e assim diminuindo a produção de EROs (ADAMS, V. et al., 2005; BRIONES; TOUYZ, 2009; CAMPOS; GOMES; FERREIRA, 2013; MASSON et al., 2014).

Masson et al. (2014) analisaram o PVN de ratos normotensos e hipertensos, treinados e não treinados e observaram que os ratos hipertensos possuíam maior expressão de subunidades do complexo enzimático NADPH oxidase (p47phox/gp91phox), como maior produção de EROs quando comparados aos normotensos. E que o TF foi eficiente em reduzir a expressão dessas subunidades do complexo enzimático, como reduzir a produção de EROs. Da mesma forma, Rush et al. (2002) constataram tanto aumento na atividade da enzima superóxido dismutase como diminuição na produção protéica do complexo enzimático NADPH oxidase na aorta de porcas submetidas a protocolo de TF aeróbio moderado.

Mais recentemente, Roque et al. (2013) observaram uma diminuição da PA associada a diminuição do estresse oxidativo e ao aumento da biodisponibilidade de NO em ratos hipertensos após TF aeróbio de baixa/moderada intensidade.

Além do TF possibilitar a redução do estresse oxidativo associado diminuição da HA, ele também tem se mostrado eficaz na melhora do balanço entre a produção e a remoção de EROs relacionado a atrofia muscular (CUNHA et al., 2012). Como mostrado pelo estudo de Bechara et al. (2012), o TF por 8 semanas foi capaz de prevenir a atrofia muscular no músculo plantar, associada a prevenção da hiperativação do complexo enzimático NADPH oxidase e do UPS induzidos pelo infarto do miocárdio em ratos com atrofia muscular provocada pela insuficiência cardíaca.

Assim, sabendo que alterações no sistema nervoso, na periferia, bem como o estresse oxidativo possam ser importantes mecanismos envolvidos na HA induzida por DEX e este último na atrofia muscular, e que o TF moderado é capaz de promover ajustes crônicos nesses mecanismos, auxiliando na prevenção/atenuação das alterações, é plausível acreditar que o TF, realizado antes e concomitante ao tratamento com DEX, seja capaz de diminuir a PA dos animais por promover ajustes no sistema nervoso, na musculatura esquelética, bem como na quantidade de EROs. Além disso, é possível pensar que a melhora do balanço entre a remoção e a produção das EROs na musculatura esquelética possa auxiliar em uma possível atenuação/prevenção da atrofia muscular.

## 2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi investigar se a HA induzida pela DEX está associada com alterações no sistema nervoso autônomo, na microcirculação e/ou com o desbalanço entre a produção e a remoção das EROs. Além disso, avaliar se a diminuição da PA induzida pelo TF aeróbio está associada a um melhor ajuste nestes mecanismos.

Ainda, pretendeu-se investigar se a atrofia muscular provocada pelo tratamento com a DEX também estaria envolvida com o desequilíbrio entre a produção e a remoção das EROs e se o TF poderia contribuir para melhora desse desequilíbrio.

Os objetivos específicos foram

1/ Determinar se o aumento da PA induzido pelo tratamento com DEX está associado a alterações no sistema nervoso autônomo, na microcirculação e/ou desbalanço entre a produção e a remoção de EROs. Para isso foi realizada a análise espectral para investigar o balanço autonômico para o coração e a atividade nervosa simpática para os vasos. Nos músculos TA e sóleo (SOL) foi verificada a densidade capilar, razão capilar fibra e a razão parede luz das arteríolas. E realizada também uma citometria de fluxo para quantificar as espécies reativas de oxigênio nas células endoteliais da aorta.

2/ Determinar se a diminuição da PA induzida pelo TF está associada a um melhor ajuste dos mecanismos centrais e periféricos. Para isso foram realizadas as mesmas técnicas que no objetivo 1 nos animais treinados.

3/ Determinar se a atrofia muscular provocada pelo tratamento com DEX está associada ao desbalanço entre a produção e a remoção das espécies reativas de oxigênio e se o treinamento físico poderia contribuir para melhora desse desequilíbrio. Para isso foram analisadas a expressão gênica e produção proteica das enzimas antioxidantes (SOD-1, SOD-2 e CAT) e das subunidades do complexo enzimático NADPH oxidase (gp91phox e p47phox) nos grupos sedentários e treinados tratados ou não com DEX.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 76 ratos (Wistar) provenientes do Centro de Pesquisa e Produção de animais da UNESP, Botucatu, SP, com idade jovem de 7-8 semanas (250-300g). Durante o protocolo experimental os animais foram mantidos em gaiolas com até cinco animais, no Biotério de Manutenção da Faculdade de Ciências da UNESP, campus de Bauru, em ciclo claro escuro de 12:12 horas e temperatura controlada de

22°C, a ração e água foram fornecidas *at libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências, UNESP-BAURU (Processo nº 1436/2014) (ANEXO 1).

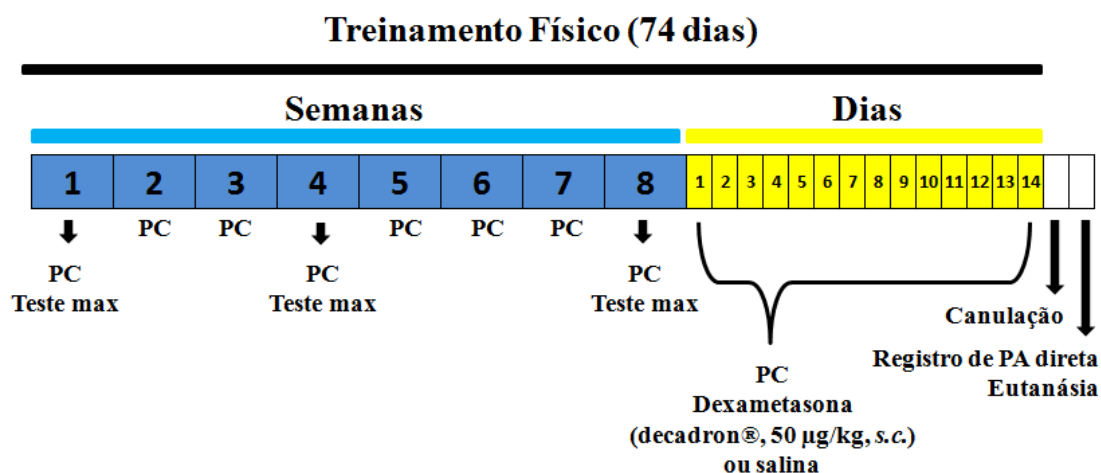
### **3.1 Capacidade física máxima dos animais**

Os animais passaram por 10 dias de adaptação à esteira (modificada para ratos, possuindo 10 raias suspensas de ferro, Inbramed, Millennium). Posteriormente, todos os animais realizaram o Teste de esforço máximo (TEM-1) que determinou a capacidade física máxima de forma indireta. Foi utilizado o protocolo adaptado de Silva et al. (1997) que preconiza aumentos de 3m/min a cada 3 min de exercício na esteira até a exaustão. Este teste foi repetido após 4 (TEM-2) e 8 (TEM-3) semanas para reajuste das velocidades, visando a garantia da manutenção da intensidade até o final do protocolo. Importante destacar que os animais sedentários foram colocados a cada 15 dias na esteira para permanecerem adaptados e realizaram os testes máximos nos mesmos períodos que os treinados.

### **3.2 Grupos experimentais**

Posteriormente ao teste de esforço máximo, os animais foram divididos em quatro grupos, distribuídos de forma que, no final, os quatro grupos não apresentaram diferenças entre capacidade física e peso corporal.

GRUPO 01 – 10 animais que permaneceram sedentários durante todo o período do experimento e receberam tratamento com salina; GRUPO 02 – 10 animais que permaneceram sedentários durante todo o período do experimento e receberam tratamento com dexametasona (Decadron, 50µg/kg por dia, s.c.); GRUPO 03 – 10 animais que realizaram o treinamento físico por 74 dias, inclusive durante o tratamento, e receberam tratamento com salina; GRUPO 04 - 10 animais que realizaram o treinamento físico por 74 dias, inclusive durante o tratamento, e receberam tratamento com dexametasona (Decadron, 50µg/kg por dia, s.c.). A Figura 2 demonstra o protocolo experimental que foi utilizado.



**Figura 2:** linha do tempo do protocolo experimental, peso corporal (PC), teste máximo (Teste max), pressão arterial (PA).

### 3.3 Protocolo de treinamento físico

Os animais foram submetidos a um período de TF em esteira ergométrica durante uma hora por dia, por 8 semanas, com intensidade de 60% da velocidade máxima atingida no teste de esforço máximo. Durante os 14 dias de tratamento com DEX os animais treinados continuaram seu treinamento.

### 3.4 Tratamento farmacológico

Foi utilizado o Decadron injetável (fosfato dissódico de dexametasona - 4mg/ml ampola de 2,5ml) do laboratório farmacêutico Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A. Esse fármaco contém 3,33 mg de DEX, que foi diluído em salina e em cada animal foi administrada a dose de 50µg/kg por dia, de forma subcutânea (s.c.), durante 14 dias. O tratamento foi realizado diariamente até às 9h da manhã.

### 3.5 Determinação da pressão arterial direta e análise espectral

#### 3.5.1 Confeção de cânulas

Para a confecção das cânulas foram utilizados tubos de polietileno PE-50 (Scientific Commodities Inc.), aos quais foram previamente soldados a tubos de polietileno PE-10 (Scientific Commodities Inc), como previamente publicado por Amaral et al. (2000).

Os animais foram então anestesiados com Tribromo Etanol (2,5g/100ml) 1ml para cada 100g do peso corporal e posteriormente realizada a incisão no pescoço do animal. Após a localização da artéria carótida foi introduzida no local, a parte mais fina da cânula preenchida com solução fisiológica heparinizada, já a outra parte da cânula foi exteriorizada na região dorsal do animal. Logo após o término do procedimento foi aplicado analgésico (Banamine 0,3 ml por animal) de forma cutânea e esperadas 24 horas para recuperação do animal.

### **3.5.2 Registro de PA e frequência cardíaca**

Após a recuperação da cirurgia por 24h, a pressão arterial foi registrada continuamente nos ratos acordados, pela conexão da cânula da artéria carótida ao sistema de registro (transdutor + pré-amplificador, ADInstruments<sup>®</sup>), conectado ao computador. PA pulsátil e a FC foram registrados utilizando o software LabChartPro.

### **3.5.3 Análise espectral**

O registro da pressão arterial e do intervalo de pulso dos animais (15-30 minutos com frequência de amostragem de 2000 Hz) foram processados pelo software LabChart v7.0, ADInstruments, NSW, Australia, que detectou os pontos de inflexão ciclo por ciclo no sinal da pressão arterial pulsátil, determinando os valores da pressão sistólica batimento por batimento. A variabilidade da FC e da pressão arterial sistólica (PAS) foram analisadas no domínio da frequência a partir do software desenvolvido por Daniel Penteado Martins Dias da Universidade de São Paulo (USP) (CardioSeries V2.4, <http://www.danielpenteado.com>).

A análise da variabilidade da FC foi realizada por meio da decomposição do sistograma pela Transformada Rápida de Fourier e a variabilidade da PAS por meio do tacograma do registro da PAS. A partir desses dados a potência das bandas de baixa frequência (BF, 0,20-0,75 HZ) e das bandas de alta frequência (AF, 0,75-3,0 HZ) foram determinadas, correspondendo respectivamente à atividade nervosa simpática e parassimpática. O balanço simpato-vagal foi analisado por meio da razão BF/AF (SILVA et al., 2015).

### **3.6 Citometria de fluxo**

#### **3.6.1 Isolamento de células endoteliais de aorta de ratos**

Posteriormente à eutanásia (decapitação), as aortas dos animais foram isoladas, dissecadas, cortadas longitudinalmente e mantidas em solução Hanks completa modificada (CaCl<sub>2</sub> 1,6 mmol/L; MgCl<sub>2</sub> 1,0 mmol/L; NaCl 120,0 mmol/L; KCl 5,0 mmol/L; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 mmol/L; dextrose 10,0 mmol/L; HEPES 10,0 mmol/L; pH 7,4). A remoção das células endoteliais foi feita mecanicamente com o auxílio de uma haste plástica e posteriormente centrifugadas com solução de Hanks (1000 rpm por minuto, durante 5 minutos) em temperatura ambiente. Após, o sobrenadante foi desprezado, o pellet suspenso em solução Hanks e 250 µL desta suspensão foram pipetados em tubos de poliestireno. As células permaneceram acondicionadas na temperatura de 37° C até o momento do experimento.

No citômetro de fluxo, foi feita a leitura de 5000 eventos (células) de cada aorta utilizada. O número de experimentos realizados (n) se refere ao número de aortas utilizadas para cada grupo estudado. As análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACs Canto BD, software FACs DIVA utilizando sondas específicas para EROs conforme o seguinte protocolo experimental.

#### **3.6.2 Quantificação da concentração de Espécies Reativas de Oxigênio**

Para quantificação de EROs, a suspensão de células endoteliais sem qualquer estímulo prévio, foi submetida à leitura para verificar a emissão de fluorescência basal (branco). A suspensão de células foi então incubada por 20 min com a sonda fluorescente Dihidroetidina (DHE 2,5 µmol/L, Sigma Aldrich Company, USA), excitada com laser azul em 488 nm, com emissão de 530/30 nm e a intensidade de fluorescência emitida foi verificada. Os valores foram expressos pelo aumento da intensidade de fluorescência (IF) comparado com o basal. A mediana da IF foi comparada entre os grupos.

### **3.7 Retirada dos músculos**

Posteriormente aos protocolos experimentais, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico ANASEDAN<sup>®</sup> (cloridrato de xilasina, 20mg/Kg), CEVA e

DOPALEN<sup>®</sup> (cloridrato de quetamina, 160mg/Kg), VETBRANDS do Brasil (na proporção de 1:1, 1mg/kg de peso corporal). Após a confirmação da eutanásia, os tecidos musculares SOL e TA foram removidos, limpos, imediatamente pesados e separados para análise de expressão gênica, produção proteica ou processamento histológico.

### **3.7.1 Extração de RNA total**

Todos os procedimentos para avaliação da expressão gênica foram realizados na FOB-USP pela colaboração do Prof. Titular. Carlos Ferreira dos Santos, que é responsável pelo equipamento de PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real Vii7 (AppliedBiosystems®, Estados Unidos), adquirido em processo Multiusuário FAPESP (2009/53848-1).

Foi utilizado o RNeasy mini kit (Qiagen) para a extração do RNA segundo o fabricante. Anteriormente, os tecidos SOL e TA foram homogeneizados na solução de lise do kit e álcool absoluto foi adicionado. Após a homogeneização todo o homogenato foi colocado nas colunas de purificação do kit e centrifugado em temperatura ambiente na velocidade máxima por 1 minuto. Posteriormente, o RNA foi retido nesta coluna, a qual foi lavada por dois tampões específicos antes da eluição do RNA em água livre de RNase.

### **3.7.2 Quantificação e qualificação do RNA**

Depois de reconstituído, o RNA total das amostras foi mensurado e qualificado no espectrofotômetro Nanodrop 1000 ThermoScientific (USA). Para isso foram utilizados 2µL de cada amostra para obtenção das leituras nos comprimentos de onda de 260 nm (A260) e 280 nm (A280), os quais forneceram informações sobre a quantidade e qualidade do RNA. Amostras com valores entre 1,9 e 2,1 na relação A260/A280 foram transcritas.

### **3.7.3 Tratamento do RNA total com DNase e transcrição reversa**

Com o intuito de evitar a possibilidade de contaminação do RNA total extraído por DNA genômico, todo o tratamento das amostras foi realizado com DNase



(gDNAwipeout - Qiagen, Alemanha) durante 2 minutos a 42°C sendo este procedimento realizado segundo as orientações do fabricante.

As amostras com 1µg de RNA total cada foram tratadas com DNase e imediatamente submetidas ao processo de transcrição reversa com o kit Quantitect® ReverseTranscription (Qiagen). Neste RNA tratado com DNase foi adicionado uma mistura 1 µL dos primers randômicos e oligodT, 1 µL da transcriptase reversa e 4 µL do tampão Quantscript RT. Esta mistura foi incubada a 42°C por 30 min, seguido de outra incubação a 95°C por 3 min.

### **3.7.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa**

A quantificação relativa das subunidades do complexo enzimático NADPH oxidase (gp91phox e p47phox) e das enzimas antioxidantes SOD-1, SOD-2, CAT foram analisadas por meio de reações de PCR em tempo real, utilizando o sistema Taqman (Applied Biosystems, Foster City, USA) em um aparelho Viia7 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Os ensaios utilizados foram da Applied Biosystems, Foster City, USA. Esse sistema realiza as reações de amplificação, detecção de nucleases fluorogênicas e quantificação relativa a um ou dois genes de referências (Beta actina e/ou GAPDH) por meio do software Viia7 versão 1.1. Para a reação foram adicionados aos poços da placa de reação de PCR, o DNA complementar sintetizado a partir do RNA mensageiro, o Taqman gene expression mastermix (Applied Biosystems, USA) e cada ensaio constante na Quadro 1.

A ciclagem térmica consistiu de uma incubação de 2 min a 50°C, seguida de outra incubação de 10 min a 95°C e 40 ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C. Para cada reação de volume final de 5uL, foi utilizado 1 uL da amostra (a 50ng/uL), 2,5 uL do Taqman gene expressionmastermix, 0,25 uL dos primers e sondas (ensaio inventariado) e 1,25 uL de água milliQ.

Quadro 1: Números de catálogo para PCR inventoriados (AppliedBiosystems).

<b>ALVO</b>	<b>Número de catálogo</b>
GAPDH	Rn01775763_g1
gp91phox	Rn00576710_m1
p47phox	Rn00586945_m1
SOD-1	Rn00566938_m1
SOD-2	Rn00690588_g1
CAT	Rn00560930_m1

### 3.7.5 Protocolo de dosagem de proteína

O SOL e TA foram homogeneizados com um homogeneizador Polytron em uma solução de RIPA (Cell Signaling Technology, Inc) contendo vários inibidores de proteases. No momento da homogeneização foram adicionados 1% de PMSF e 0,1% de PIC (Coquetel inibidor de protease, Sigma Aldrich). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos com aceleração e desaceleração igual a 7 na temperatura de 4 graus, em seguida o sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo.

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford utilizando o kit comercial Bio-Rad kit, laboratories, Inc, Hercules, CA com albumina (Protein Assay Standard II, Bio-Rad) como padrão (AMARAL et al., 2001). Os valores de absorbância foram analisados no leitor de microplacas (BMG Labtech, Spectro Star nano) utilizando uma placa de 96 poços. Após a dosagem, as amostras foram estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem utilizadas para os experimentos de Western Blotting.

### 3.7.6 Procedimento de Western Blotting

As proteínas foram eletroforéticamente separadas por tamanho, usando um sistema de gel de poliacrilamida conforme publicação prévia do laboratório (AMARAL et al., 2001). Um gel com duas camadas de poliacrilamida, em diferentes concentrações: 5% na camada superior e de 8 a 12% na camada inferior, dependendo do peso molecular da proteína. A solução tampão de corrida consistiu de: 190 mM de glicina, 25 mM de Tris, 0,1% de SDS, pH 8,3. As amostras foram colocadas para correr por

aproximadamente 60 minutos a 200 V. Marcadores de peso molecular (Bio-Rad) foram simultaneamente utilizados como tamanho padrão. As proteínas foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose com aplicação de corrente de 120 v por 1 hora e meia em um tampão: 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 coloração de *Ponceau* e imediatamente depois as membranas foram lavadas em solução TBS-T (0,95g de Trisma -HCl; 0,50g de Trisma Base; 8,8g de NaCl e 1ml de Tween 20 para um litro de água destilada). Na etapa seguinte foi utilizado o aparelho Snapi.d (Millipore) para incubação das membranas com solução bloqueadora com 5% de albumina diluída em solução TBS-T por 2 min e incubadas por 10 min com diluição apropriada do anticorpo para anti-gp91phox (Millipore, Billerica, MA, 1:500), anti-p47phox (Millipore, Billerica, MA, 1:500), anti-Cu/Zn SOD (SOD-1) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, 1:1000), anti-MnSOD (SOD-2) (Enzo Life Sciences International, Inc., Plymouth Meeting, PA, 1:1000), anti-catalase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, 1:1000) e GAPDH (ReD system, 1:1000) para normalização. Logo após, as membranas foram lavadas por 3 vezes de 5 ml com solução TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário, IgG anti-rabbit, anti mouse ou anti-goat dependendo da origem de cada anticorpo primário, por 10 minutos e depois lavado. O anticorpo foi detectado por luminescência química aumentada (Super signal Pico, Pierce®) e as membranas foram expostas a filme de radiografia. As bandas foram analisadas utilizando um programa de computador (Scion Image, Corporation, 0.4.0.2) a qual foi comparada com o grupo sedentário controle (SC), sendo este considerado como 100%.

### **3.7.7 Análises morfométricas**

Os tecidos musculares do SOL e TA depois de retirados foram imediatamente envolvidos por talco neutro, cobertos com *tissueteck* e mergulhados em nitrogênio líquido. Após o congelamento, as amostras foram armazenadas no freezer a -80° C para posterior processamento.

Todo o material coletado congelado foi colocado no criostato (temperatura de -20°C), (Leica®, CM 1850, Nussloch, Alemanha) para realização de cortes transversais 5-10 µm e, em seguida, as fatias foram colocadas nas lâminas para o processamento das técnicas de coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) e processadas para estudo de

alterações vasculares no tecido muscular em microscópio de luz, determinando a densidade capilar, a área de secção transversa das fibras musculares, razão capilar/fibra nos músculos TA e SOL e a razão parede/luz das arteríolas presentes na musculatura esquelética (MOURA et al., 2011).

Para realização das análises foram efetuadas quatro lâminas para cada animal, sendo que em cada uma foram colocados de seis a oito cortes histológicos, que posteriormente foram corados com HE. Sendo assim, a partir dessas amostras foram capturadas seis fotos pelo programa DP Controller, na objetiva de 20x no microscópio Olympus Bx50.

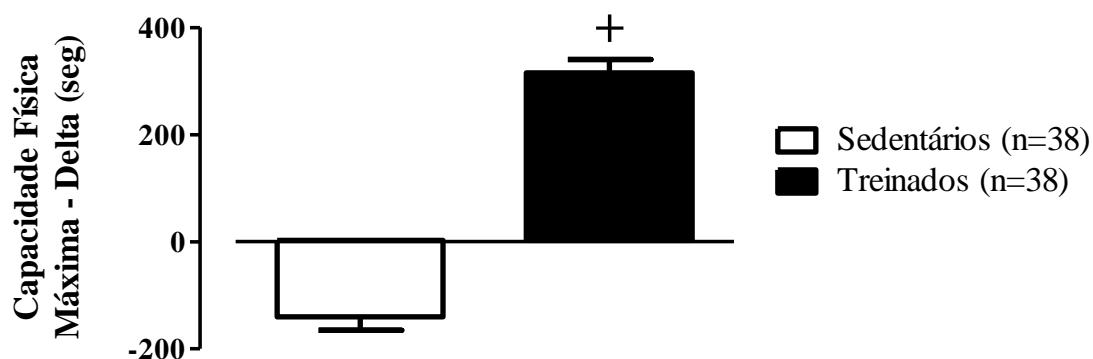
Para determinação da densidade capilar, da área de secção transversa das fibras musculares e da razão capilar/fibra foi realizada a média da análise de quatro a seis fotos (4080 x 3072  $\mu\text{m}^2$ ), as quais foram analisadas pelo programa Image.pro Plus 6.2. A densidade capilar foi obtida pela contagem da quantidade de capilares identificados em cada foto, a razão capilar/fibra obtida pela razão entre a quantidade de capilares e a quantidade de fibras identificadas e a área de secção transversa das fibras musculares obtida por meio da verificação da área em micrômetros quadrados das fibras musculares localizadas nas imagens (média de 5 fibras). Já a razão parede/luz das arteríolas da microcirculação foi determinada da seguinte forma: identificando as arteríolas nos cortes histológicos, foi verificado o diâmetro e raio interno e externo, aos quais a partir da fórmula: diferença do diâmetro externo – diâmetro interno dividido por dois, sendo o resultado dividido pelo diâmetro interno encontra-se a razão parede luz da arteríola as quais, posteriormente, foram utilizadas para realizar a média referente ao animal e do grupo.

### **3.8 Métodos estatísticos**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Foi utilizada a análise de variância ANOVA de dois caminhos, sendo um caminho o treinamento e o outro o tratamento ou teste *T-student*, para comparação entre dois grupos. As amostras que apresentaram diferenças significativas foram analisadas pelo post-hoc de Tukey. O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ .

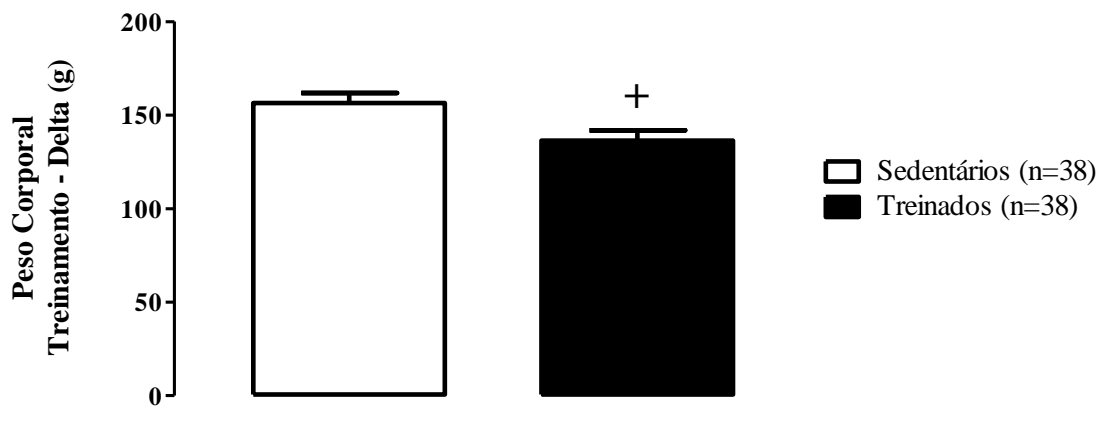
#### 4 RESULTADOS

Os animais, tanto treinados como sedentários, realizaram três testes para avaliação da capacidade física máxima, sendo eles: antes, durante (4ª semana) e ao final do período de treinamento físico (8ª semana). Na Figura 3 pode ser observado o resultado em delta entre o teste máximo realizado no final e antes do período de treinamento dos ratos treinados (n=38) e sedentários (n=38). Os animais treinados melhoraram sua capacidade física, apresentando um delta de  $315,3 \pm 24,9$ seg, sendo esse aumento significativo quando comparado ao grupo sedentário, que teve sua capacidade física reduzida após dois meses com delta de  $-140,5 \pm 24,5$ seg.



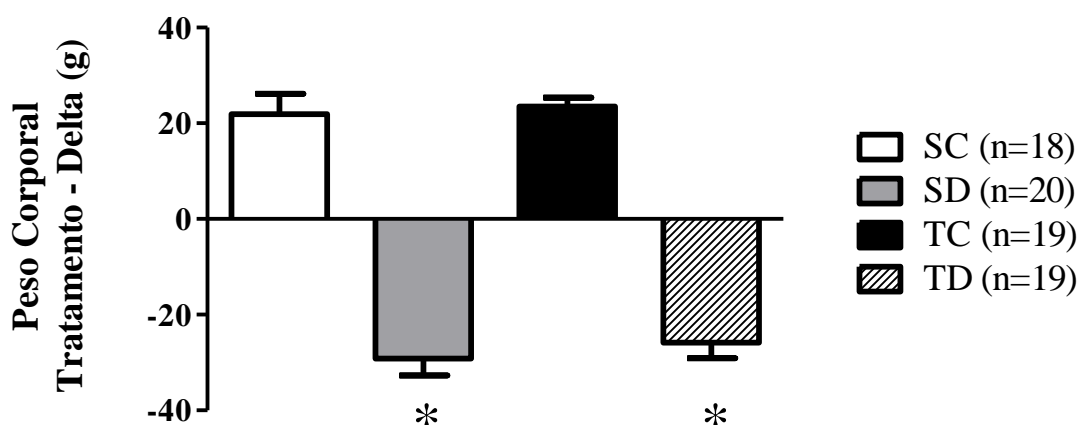
**Figura 3:** Delta da capacidade física máxima, comparando os valores após e antes do período de treinamento físico dos ratos sedentários (n=38) e treinados (n=38). Significância: + vs sedentários;  $p < 0,05$ .

Com relação ao peso corporal dos animais, a Figura 4 mostra o delta do peso corporal antes e ao final das oito semanas de treinamento físico, tanto dos animais sedentários (n=38) como dos animais treinados (n=38). Observa-se que ambos os grupos (sedentários e treinados) aumentaram seu peso corporal durante esse período ( $+156,4 \pm 5,3$ gramas e  $+136,3 \pm 5,4$ gramas, para sedentários e treinados, respectivamente). Contudo, os animais treinados apresentaram um aumento de peso significativamente menor que o grupo sedentário.



**Figura 4:** Delta do peso corporal durante o período de treinamento físico na esteira nos animais sedentários (n=38) e treinados (n=38). Significância: + vs sedentário;  $p < 0,05$ .

Já na Figura 5, observa-se o delta do peso corporal dos animais nos grupos: sedentário controle (SC, n=18), sedentário DEX (SD, n=20), treinado controle (TC, n=19) e treinado DEX (TD, n=19) ao final do período de tratamento. Pode-se observar que os animais controles, tanto sedentários (SC) como treinados (TC), apresentaram aumento do peso corporal durante o período de tratamento ( $+ 21,9 \pm 4,2$  gramas e  $+ 23,5 \pm 1,8$  gramas, para SC e TC, respectivamente), enquanto que os animais tratados com DEX, independente do treinamento físico, obtiveram redução significativa do peso corporal ao final do tratamento (SD  $-29,2 \pm 3,5$  gramas e TD  $-25,8 \pm 3,3$  gramas).

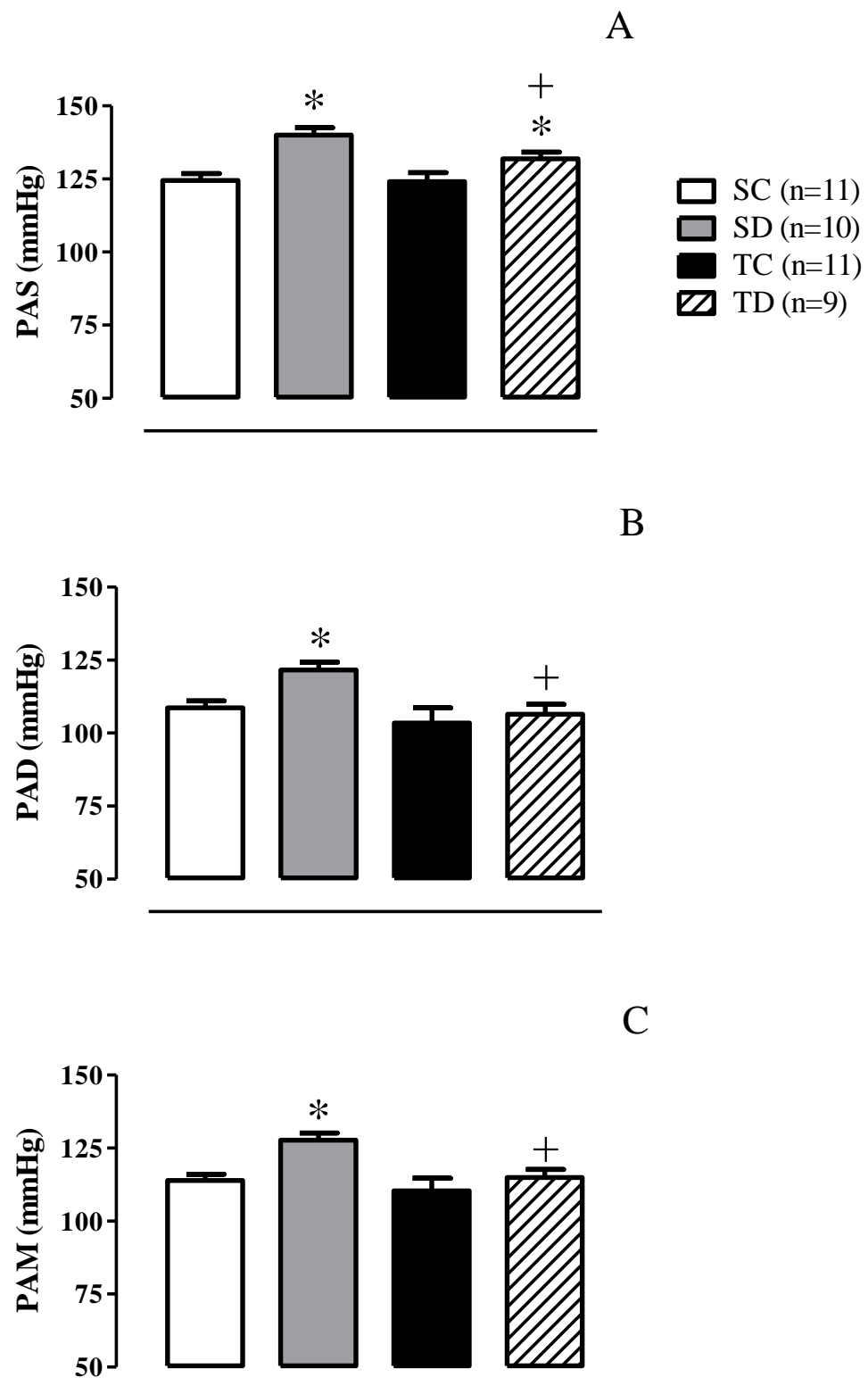


**Figura 5:** Delta do peso corporal durante o período de tratamento com dexametasonanos grupos: sedentário controle (n=18), sedentário dexametasona (n=20), treinado controle (n=19) e treinado dexametasona (n=19). Significância: \* vs controle;  $p < 0,05$ .

### Análises hemodinâmicas

Os resultados de PA direta podem ser observados na Figura 6 para PAS, pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM), respectivamente. Pode-se observar que o tratamento crônico com DEX aumentou significativamente a PAS no grupo SD ( $140 \pm 2,4\text{mmHg}$  vs  $124 \pm 2,3\text{mmHg}$ , vs SC)(Painel A), a PAD ( $121 \pm 2,6\text{mmHg}$  vs  $108 \pm 2,4\text{mmHg}$ , para SD vs SC)(Painel B), como também a PAM no grupo SD ( $127 \pm 2,3\text{mmHg}$  vs  $113 \pm 2,1\text{mmHg}$ , vs SC)(Painel C).

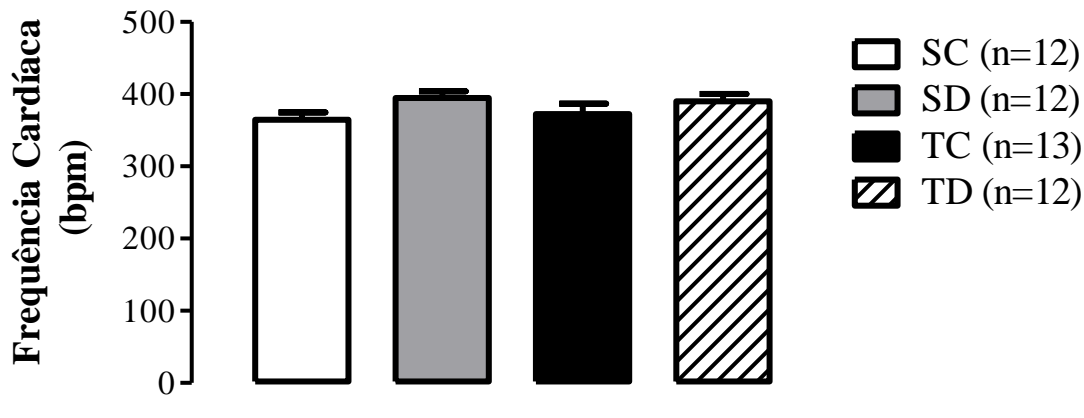
Por outro lado, o treinamento físico foi eficaz em atenuar o aumento da PAS, como observado no grupo TD, quando comparado aos animais SD ( $140 \pm 2,4\text{mmHg}$  vs  $131 \pm 2,2\text{ mmHg}$ , para SD vs TD, respectivamente). Apesar desta atenuação, os valores de PAS não foram normalizados quando comparados aos animais controle ( $131 \pm 2,2\text{ mmHg}$  vs  $124 \pm 3,0\text{mmHg}$ , vs TC, Figura 6)(Painel A).



**Figura 6:** Valores de pressão arterial sistólica (Painel A), diastólica (Painel B) e média (Painel C) dos grupos sedentários controle (SC, n=11), sedentário dexametasona (SD, n=10), treinado controle (TC, n=11) e treinado dexametasona (TD, n=9). Significância: \* vs controle, + vs sedentário;  $p < 0,05$ .



Além da PA, também foi analisada a FC dos animais. Na Figura 7 podemos observar que não houve diferença significativa entre os grupos.



**Figura 7:** Valores de frequência cardíaca dos grupos sedentários controle (SC, n=12), sedentário dexametasona (SD, n=12), treinado controle (TC, n=13) e treinado dexametasona (TD, n=12). Significância:  $p < 0,05$ .

Após realizar a eutanásia dos animais, os músculos TA, FHL, SOL, coração, ventrículo esquerdo (VE) e a glândula adrenal foram removidos e pesados. Posteriormente, o peso desses músculos foi normalizado pelo tamanho da tíbia. Observa-se na Tabela 1 que o tratamento com a DEX não acarretou alterações no peso muscular do SOL, FHL, coração e VE. Entretanto, pode-se observar que o tratamento com DEX provocou redução significativa da massa muscular do músculo TA tanto no grupo SD, comparado ao grupo SC, como no grupo TD, comparado ao grupo TC (Tabela 1).

Em relação ao peso da glândula adrenal, o tratamento com DEX determinou redução significativa do peso dessa glândula tanto no grupo sedentário como no grupo treinado tratados com DEX (Tabela 1).

**Tabela 1: Comparação dos valores de massa muscular e glândula adrenal normalizados pela tíbia entre os grupos SC, SD, TC e TD.**

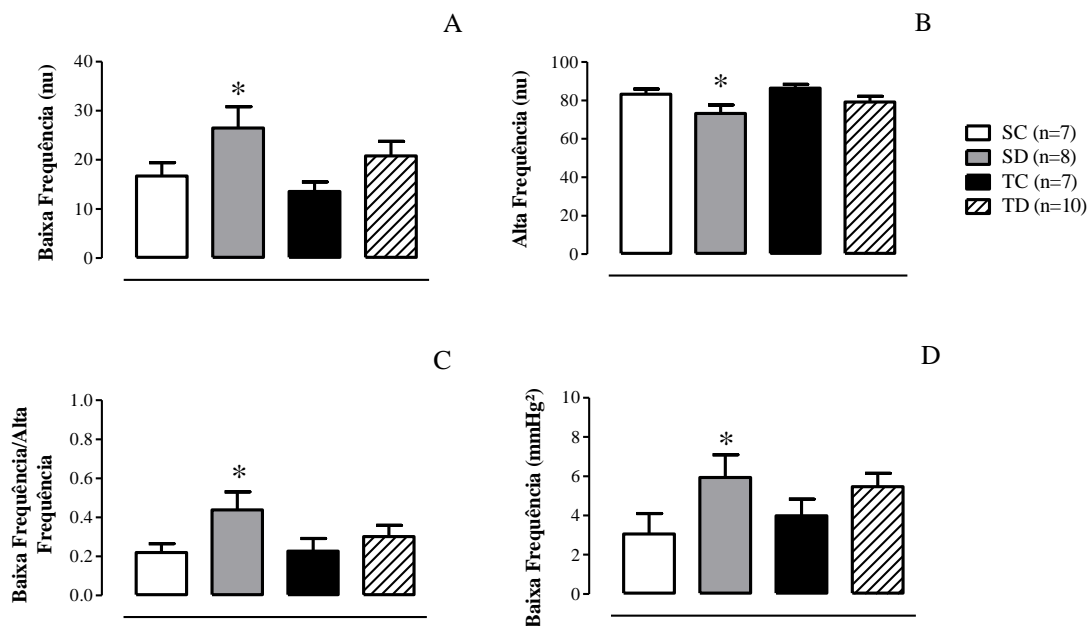
	SC	SD	TC	TD
Tíbia (cm)	4,2 ± 0,04	4,0 ± 0,02	4,1 ± 0,03	4,0 ± 0,03
TA/Tíbia (mg/cm)	176,4 ± 5,0	161,8 ± 3,0*	173,8 ± 3,1	162,4 ± 3,1*
FHL/Tíbia (mg/cm)	120,4 ± 4,3	112,4 ± 4,8	117,9 ± 2,5	107,3 ± 2,5
SOL/Tíbia (mg/cm)	39,0 ± 2,0	36,2 ± 2,0	38,3 ± 1,8	36,8 ± 1,7
Coração/Tíbia (mg/cm)	275,1 ± 5,3	263,5 ± 6,4	257,8 ± 7,8	253,9 ± 5,0
VE/Tíbia (mg/cm)	195,6 ± 6,2	182,8 ± 4,6	181,1 ± 6,3	177,3 ± 3,7
G.A./Tíbia (mg/cm)	16,7 ± 1,0	10,2 ± 0,4*	16,0 ± 1,4	10,2 ± 0,6*

Músculo tibial anterior (TA), músculo flexor longo do hálux (FHL), músculo sóleo (SOL), Ventrículo Esquerdo (VE) e Glândula Adrenal (G.A.). Significância: \* vs controle;  $p < 0,05$ .

#### Análise do balanço autonômico

Para investigar melhor os possíveis mecanismos que poderiam estar auxiliando no aumento de PA acarretado pelo tratamento crônico com DEX, foi realizada a análise do balanço autonômico para o coração e da atividade simpática para os vasos, pela técnica de análise espectral.

Na Figura 8 podemos observar que o tratamento com a DEX provocou aumento nas ondas BF ( $26,5 \pm 4,3$  nu vs  $16,7 \pm 2,7$  nu, SD vs SC)(Painel A) e na razão entre as ondas de BF/AF no grupo SD ( $0,4 \pm 0,09$  vs  $0,2 \pm 0,04$ , SD vs SC)(Painel C), bem como promoveu uma redução das ondas de AF no grupo SD ( $73,2 \pm 4,4$ nu vs  $83,2 \pm 2,7$  nu, SD vs SC)(Painel C). O treinamento físico aeróbio, por sua vez, foi capaz de atenuar todas as alterações determinadas pela DEX (Figura 8, Paineis A, B e C). O painel D da Figura 8 ilustra que o tratamento com DEX induziu aumento das ondas de BF ( $5,94 \pm 1,16$  mmHg<sup>2</sup> vs  $3,06 \pm 1,03$  mmHg<sup>2</sup>, SD vs SC), contudo essa alteração também foi atenuada pelo treinamento físico(Painel D).

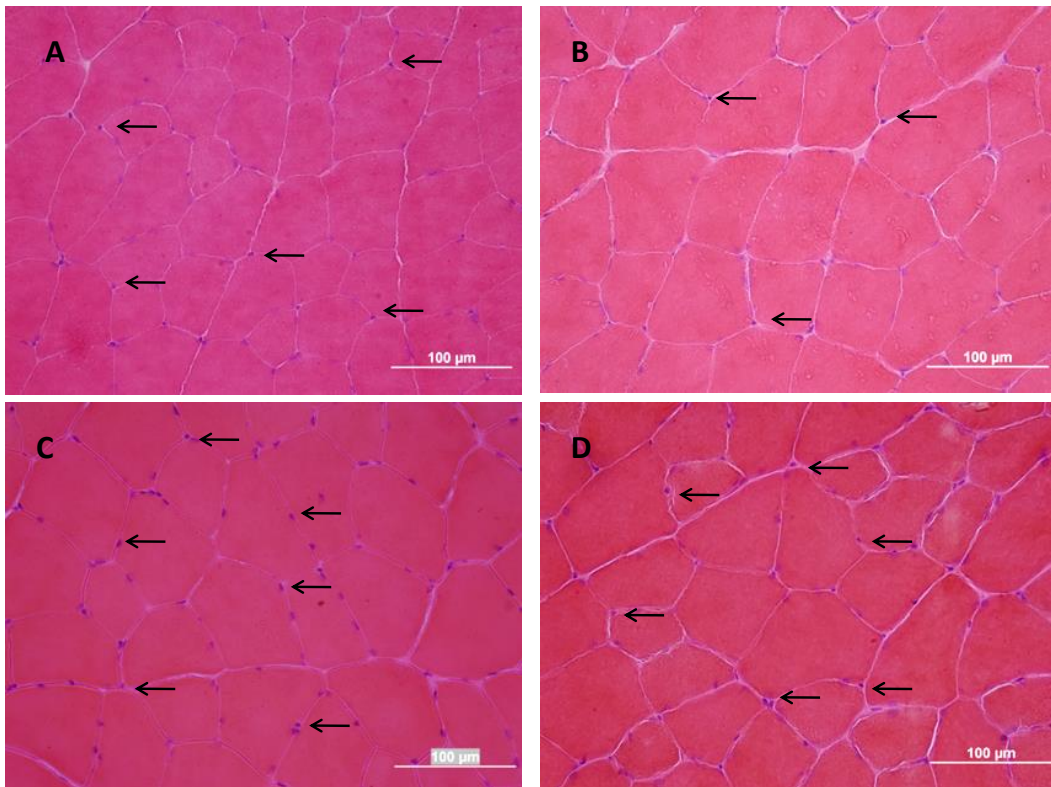


**Figura 8:** Valores das ondas de Baixa frequência (Painel A), Alta frequência (Painel B), Baixa frequência/Alta frequência (Painel C) para o coração e valores das ondas de Baixa frequência (Painel D) para os vasos dos grupos sedentários controle (SC, n=7), sedentário dexametasona (SD, n=8), treinado controle (TC, n=7) e treinado dexametasona (TD, n=10). Significância: \* vs controle;  $p < 0,05$ .

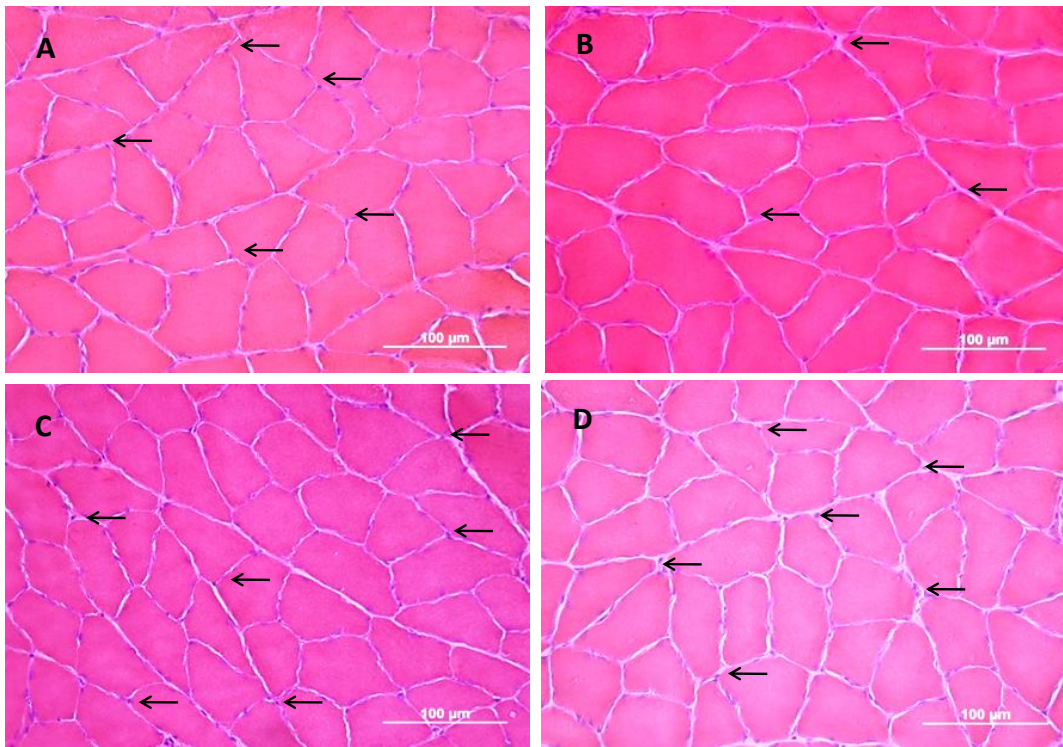
### Análises morfométricas

Os cortes transversais dos tecidos analisados (TA e SOL) foram corados com HE e submetidos à microscopia de luz para análise da área de secção transversa das fibras musculares, bem como a razão capilar/fibra e razão parede/luz das arteríolas presentes na musculatura esquelética.

Imagens da microcirculação dos músculos TA e SOL, representativas de um rato de cada grupo estão ilustradas, respectivamente, nas Figuras 9 e 10. As imagens sugerem que o tratamento com a DEX acarreta na redução de vasos (Painel B), enquanto que o treinamento físico aeróbio parece promover aumento do número de vasos, tanto no grupo TC (Painel C) como no grupo TD (Painel D), em ambos os músculos.



**Figura 9:** Imagens de cortes transversais do músculo TA tirados de um animal de cada grupo corados com hematoxilina-eosina. Representando os grupos sedentário controle (Painel A), sedentário dexametasona (Painel B), treinado controle (Painel C) e treinado dexametasona (Painel D). Setas indicam os capilares. Barra 100μm.



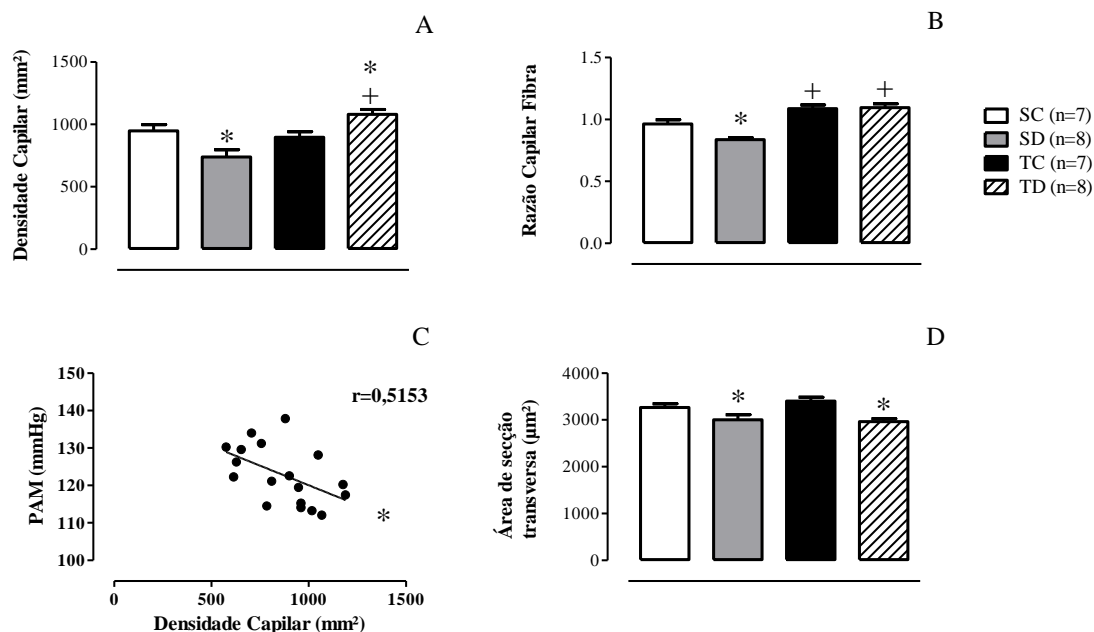
**Figura 10:** Imagens de cortes transversais do músculo SOL tirados de um animal de cada grupo corados com hematoxilina-eosina. Representando os grupos sedentário controle (Painel A), sedentário dexametasona (Painel B), treinado controle (Painel C) e treinado dexametasona (Painel D). Setas indicam os capilares. Barra 100μm.

A Figura 11 mostra os resultados densitométricos resultantes das análises morfométricas no músculo TA. Pode-se observar no Painel A que houve redução da densidade capilar no grupo SD ( $739,4 \pm 57,3$  vs  $947,4 \pm 50,6 \text{mm}^2$ , para SD vs SC), redução essa que foi prevenida pelo treinamento físico no grupo TD ( $1080,3 \pm 39,2$  vs  $739,4 \pm 57,3 \text{mm}^2$ , para TD vs SD). Além disso, observa-se que a densidade capilar no grupo TD foi significativamente maior que no grupo TC ( $1080,3 \pm 39,2$  vs  $897,1 \pm 43,4 \text{mm}^2$ , para TD vs TC).

Além dessas alterações na densidade capilar, verifica-se no Painel B (Figura 11), que a razão capilar fibra também apresentava-se reduzida no grupo SD ( $0,8 \pm 0,01$  vs  $0,9 \pm 0,03$ , para SD vs SC). Essa resposta também foi prevenida pelo treinamento físico aeróbio no grupo TD ( $1,0 \pm 0,03$  vs  $0,8 \pm 0,01$ , para TD vs SD). Além disso, também foi verificado aumento significativo na razão capilar fibra no grupo TC ( $1,0 \pm 0,03$  vs  $0,9 \pm 0,03$ , para TC vs SC respectivamente) quando comparado ao seu respectivo controle.

Quando realizada a correlação entre a densidade capilar e a PAM, observou-se uma correlação negativa significativa entre esses dois fatores (Painel C,  $r = 0,5153$ ). Entretanto, não foi encontrada correlação entre a razão capilar fibra e a PAM ( $r = 0,4153$ ), a PAD e a densidade capilar ( $r = 0,4441$ ) e a PAD e a razão capilar fibra ( $r = 0,1416$ ).

O painel D (Figura 11) mostra os resultados da área de secção transversa do músculo TA, como podemos observar, houve redução significativa no grupo SD ( $3003,5 \pm 108,3 \mu\text{m}^2$  vs  $3264,0 \pm 81,61$ , SD vs SC), como também redução significativa no grupo TD ( $2963,1 \pm 59,1$  vs  $3402,7 \pm 85,5 \mu\text{m}^2$ , TD vs TC) quando comparados aos seus respectivos controles sedentários.



**Figura 11:** Valores da densidade capilar (Painel A), razão capilar fibra (Painel B), correlação entre a densidade capilar e a PAM (Painel C) e área de secção transversa (Painel D) no músculo TA dos grupos sedentários controle (SC, n=7), sedentário dexametasona (SD, n=8), treinado controle (TC, n=7) e treinado dexametasona (TD, n=8). Significância: \* vs controle, + vs sedentário;  $p < 0,05$ .

Já, com relação ao diâmetro externo, diâmetro interno, espessura e razão parede luz das arteríolas do músculo TA, não foram encontradas nenhuma diferença significativa entre os grupos (Tabela 2).

**Tabela 2: Comparação dos valores de diâmetro externo, diâmetro interno, espessura e razão parede luz das arteríolas entre os grupos SC, SD, TC e TD do músculo TA**

	SC	SD	TC	TD
Diâmetro Externo (µm)	25,14 ± 5,0	21,2 ± 2,1	19,1 ± 2,7	21,0 ± 2,2
Diâmetro Interno (µm)	8,4 ± 1,3	8,1 ± 0,8	7,9 ± 1,2	7,8 ± 0,7
Espessura (µm)	8,3 ± 1,9	6,5 ± 0,7	5,5 ± 0,8	6,5 ± 0,8
Razão Parede Luz	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,09	0,7 ± 0,08	0,8 ± 0,08

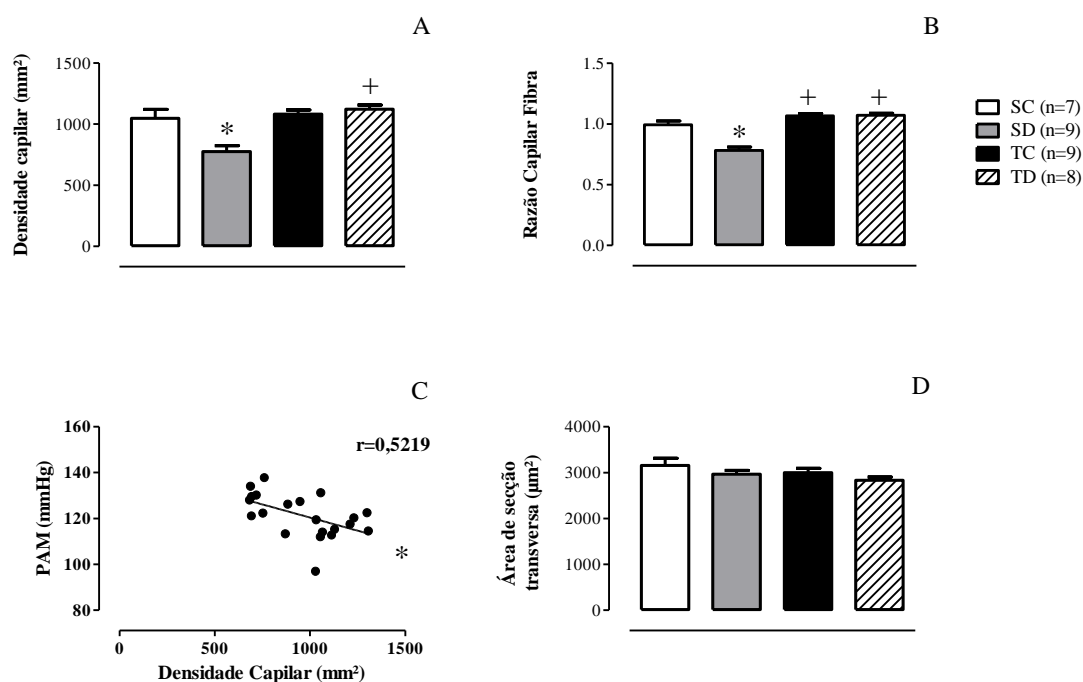
Músculo tibial anterior (TA).

A Figura 12 mostra os resultados densitométricos resultantes das análises morfométricas no músculo SOL. No Painel A pode-se observar que o tratamento com a DEX provocou redução significativa na densidade capilar no grupo SD ( $776,0 \pm 47,1$  vs

1047,7 ± 72,9 mm<sup>2</sup>, para SD vs SC) e que o treinamento físico aeróbio foi capaz de prevenir essa alteração no grupo TD (1120,9 ± 34,7 mm<sup>2</sup> vs 776,0 ± 47,1 mm<sup>2</sup>, TD vs SD).

Assim como observado no TA, o tratamento com DEX também acarretou redução significativa da razão capilar fibra no grupo SD (Painel B) (0,7 ± 0,02 vs 0,9 ± 0,03, para SD vs SC), efeito este que o treinamento físico aeróbio também foi eficiente em prevenir no grupo TD (1,0 ± 0,01 vs 0,7 ± 0,02, para TD vs SD)(Painel B). Além disso, verificou-se aumento significativo da razão capilar fibra no grupo TC, quando comparado ao seu controle sedentário (1,0 ± 0,01 vs 0,9 ± 0,03, para TC vs SC)(Painel B).

No músculo SOL, verificou-se correlação negativa significativa entre a densidade capilar e a PAM (Painel C,  $r = 0,5219$ ), razão capilar fibra e a PAM ( $r = 0,5715$ ), densidade capilar e PAD ( $r = 0,4724$ ) e razão capilar fibra e a PAD ( $r = 0,5099$ ). Ainda, foi verificada a área de secção transversa das fibras do músculo SOL e não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 12, Painel D).



**Figura 12:** Valores da densidade capilar (Painel A), razão capilar fibra (Painel B), correlação entre a densidade capilar e a PAM (Painel C) e área de secção transversa (Painel D) no músculo SOL dos grupos sedentários controle (SC, n=7), sedentário dexametasona (SD, n=9), treinado controle (TC, n=9) e treinado dexametasona (TD, n=8). Significância: \* vs controle, + vs sedentário;  $p < 0,05$ .

A Tabela 3 mostra o diâmetro externo, diâmetro interno, espessura e razão parede luz das arteríolas do músculo SOL. Como podemos observar, houve redução significativa da razão parede luz no grupo TC ( $0,7 \pm 0,05$  vs  $1,1 \pm 0,08$ , TC vs SC). Enquanto que nos outros parâmetros não foram encontradas diferenças significativas.

**Tabela 3: Comparação dos valores de diâmetro externo, diâmetro interno, espessura e razão parede luz das arteríolas entre os grupos SC, SD, TC e TD do músculo SOL**

	SC	SD	TC	TD
Diâmetro Externo ( $\mu\text{m}$ )	$23,8 \pm 2,9$	$25,5 \pm 2,6$	$27,9 \pm 2,1$	$24,2 \pm 2,4$
Diâmetro Interno ( $\mu\text{m}$ )	$8,2 \pm 1,7$	$8,7 \pm 1,03$	$11,3 \pm 0,7$	$8,8 \pm 0,5$
Espessura ( $\mu\text{m}$ )	$7,8 \pm 0,7$	$8,4 \pm 1,07$	$8,3 \pm 0,8$	$7,6 \pm 1,05$
Razão Parede Luz	$1,1 \pm 0,08$	$1,1 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,05+$	$0,9 \pm 0,1$

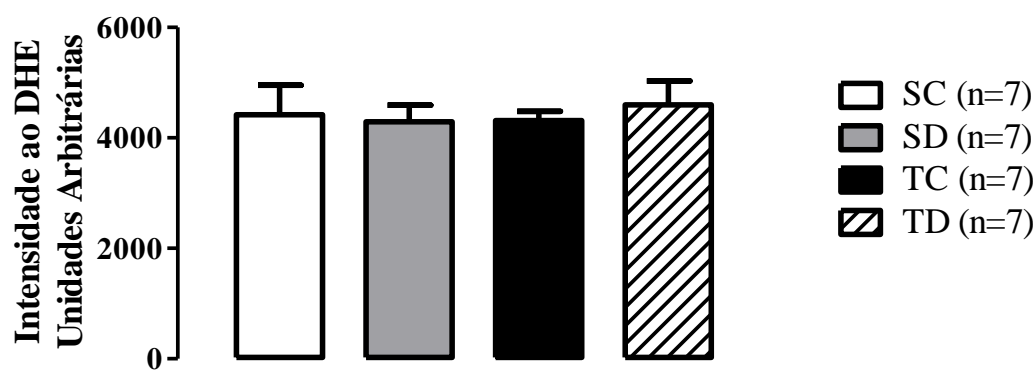
Músculo sóleo (SOL). Significância: + vs sedentário;  $p < 0,05$ .

#### Análise das espécies reativas de oxigênio

Na tentativa de investigar outros possíveis mecanismos que poderiam estar envolvidos com o aumento da pressão arterial provocada pelo tratamento com a DEX realizamos, por meio da técnica de citometria de fluxo, a quantificação das espécies reativas de oxigênio nas células endoteliais da aorta.

Na Figura 13 podemos observar que não houve diferença significativa entre os grupos.



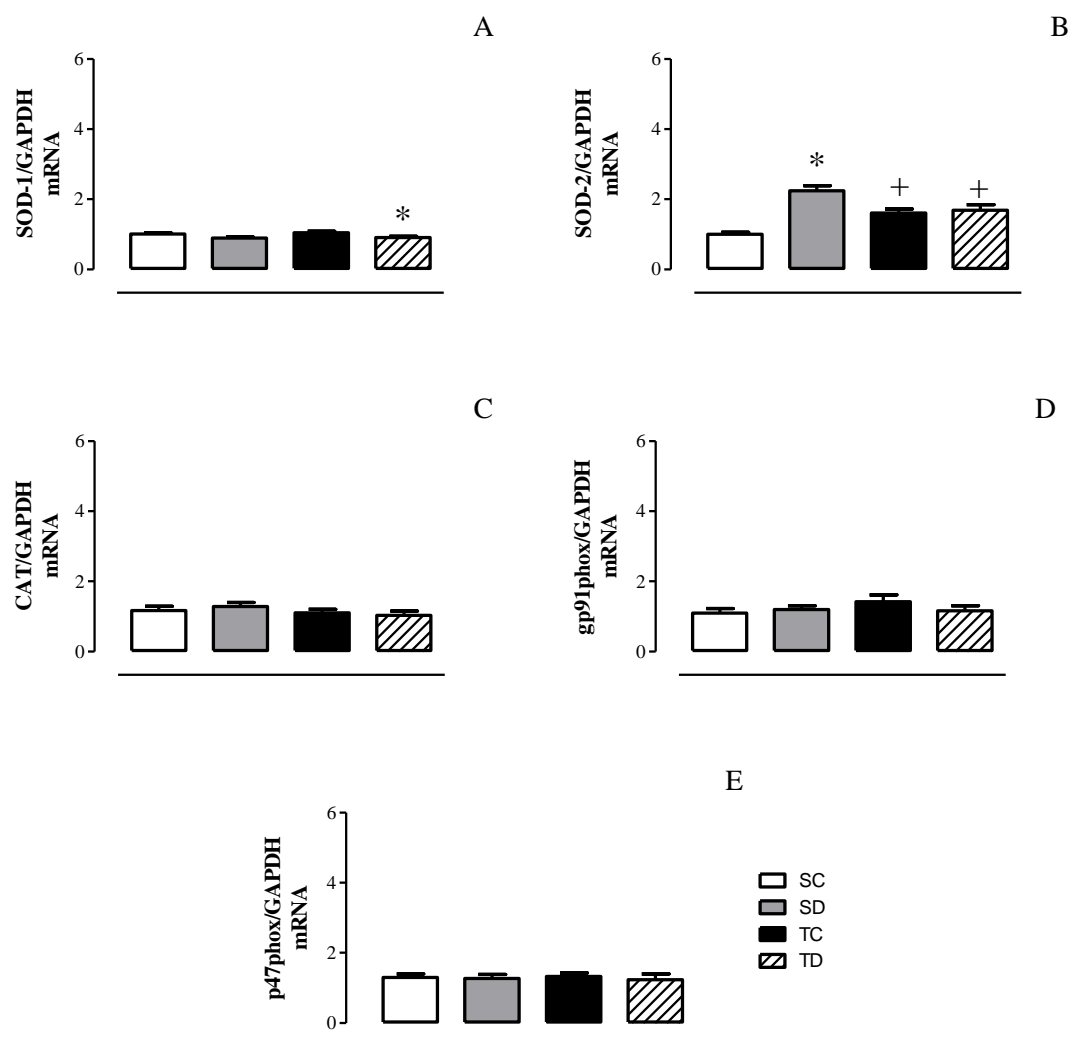


**Figura 13:** Valores da intensidade ao DHE dos grupos sedentários controle (SC, n=7), sedentário dexametasona (SD, n=7), treinado controle (TC, n=7) e treinado dexametasona (TD, n=7). Significância:  $p < 0,05$ .

### Análises de expressão gênica e produção proteica

Com o intuito de verificar se a atrofia muscular promovida pela DEX poderia estar envolvida com o estresse oxidativo, foi realizada a análise da expressão gênica e produção protéica de agentes antioxidantes e pro oxidantes nos músculos TA e SOL.

A Figura 14 ilustra os resultados de expressão gênica de componentes tanto antioxidativos como oxidativos no músculo TA. Pode-se observar que o tratamento com DEX provocou aumento da enzima antioxidante SOD-2 no grupo SD quando comparado ao grupo SC ( $2,2 \pm 0,14$  vs  $1,0 \pm 0,06$ , SD vs SC, Painel B). Já o TF promoveu aumento significativo da SOD-2 no grupo TC quando comparado ao seu respectivo controle ( $1,6 \pm 0,11$  vs  $1,0 \pm 0,06$ , TC vs SC). Os animais treinados que foram tratados com DEX apresentaram redução da enzima SOD-2 no grupo TD compara ao grupo SD ( $1,6 \pm 0,15$  vs  $2,24 \pm 0,14$ , TD vs SD, Painel B), bem como redução na SOD-1 no grupo TD, quando comparado ao seu controle ( $0,9 \pm 0,03$  vs  $1,04 \pm 0,04$ , TD vs TC, Painel A). Não foram observadas diferenças significativas na enzima catalase (Painel C) e nas subunidades do complexo enzimático NADPH oxidase gp91phox (Painel D) e p47phox (Painel E).

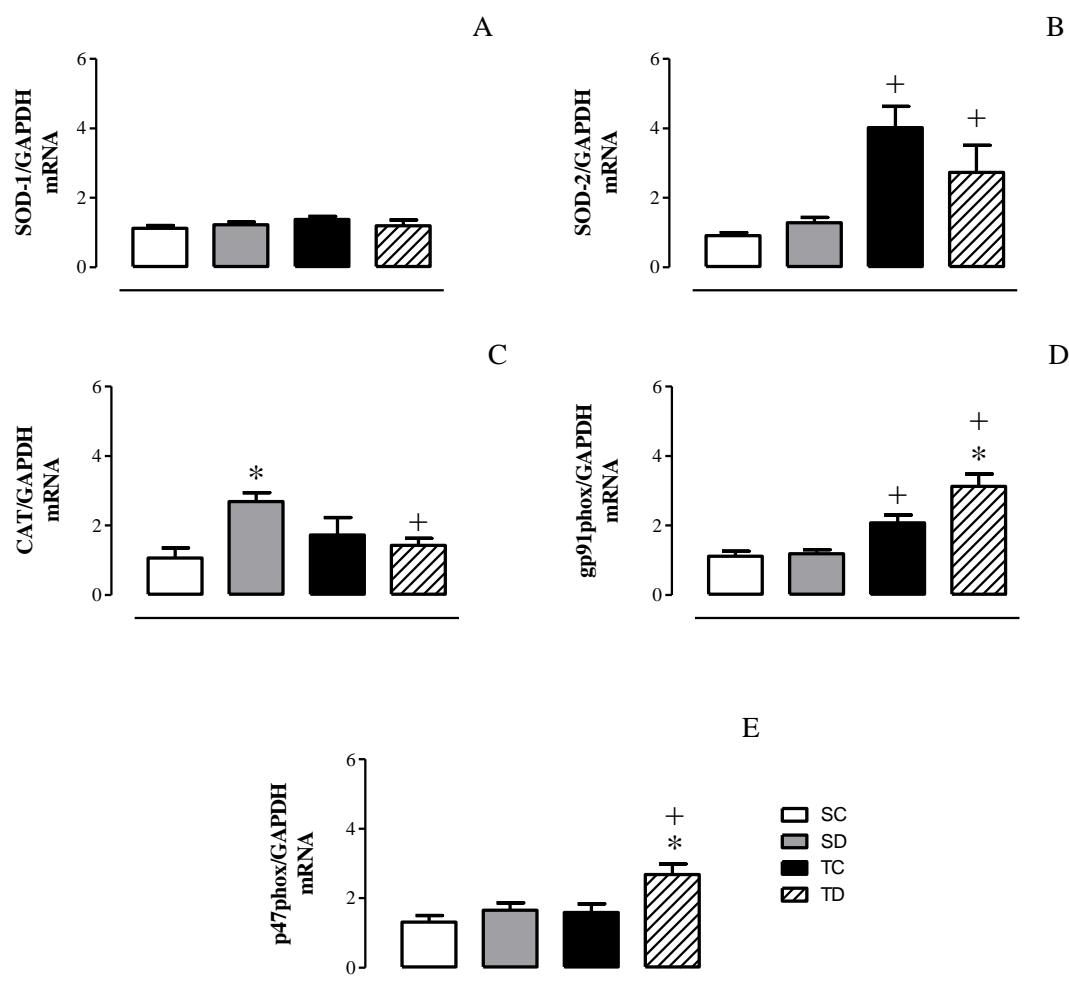


**Figura 14:** mRNA da SOD-1 (Painel A), SOD-2 (Painel B), CAT (Painel C), gp91phox (Painel D) e p47phox (Painel E) normalizado por GAPDH no músculo TA dos grupos sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD). O número de ratos usados para a expressão gênica foi de 9 a 16 por grupo. Significância: \* vs controle, + vs sedentário;  $p < 0,05$ .

A Figura 15 mostra os resultados da expressão gênica no músculo SOL dos mesmos alvos investigados no músculo TA. A DEX provocou aumento significativo na catalase no grupo SD ( $2,6 \pm 0,25$  vs  $1,0 \pm 0,3$ , SD vs SC, Painel C). Os animais somente treinados apresentaram aumento na expressão gênica da SOD-2 ( $4,0 \pm 0,61$  vs  $0,9 \pm 0,08$ , TC vs SC) e gp91phox ( $2,0 \pm 0,2$  vs  $1,1 \pm 0,1$ , TC vs SC, Painel D),

Já o TF foi capaz de prevenir o aumento da catalase nos animais tratados ( $1,4 \pm 0,2$  vs  $2,6 \pm 0,25$ , TD vs SD, Painel C). Além disso, o TF nos animais tratados determinou aumento de SOD-2 ( $2,7 \pm 0,7$  vs  $1,2 \pm 0,1$ , TD vs SD, Painel B), de gp91phox ( $3,1 \pm 0,3$  vs  $1,1 \pm 0,1$ , TD vs SD, Painel D) e de p47 phox ( $2,6 \pm 0,3$  vs  $1,6 \pm$

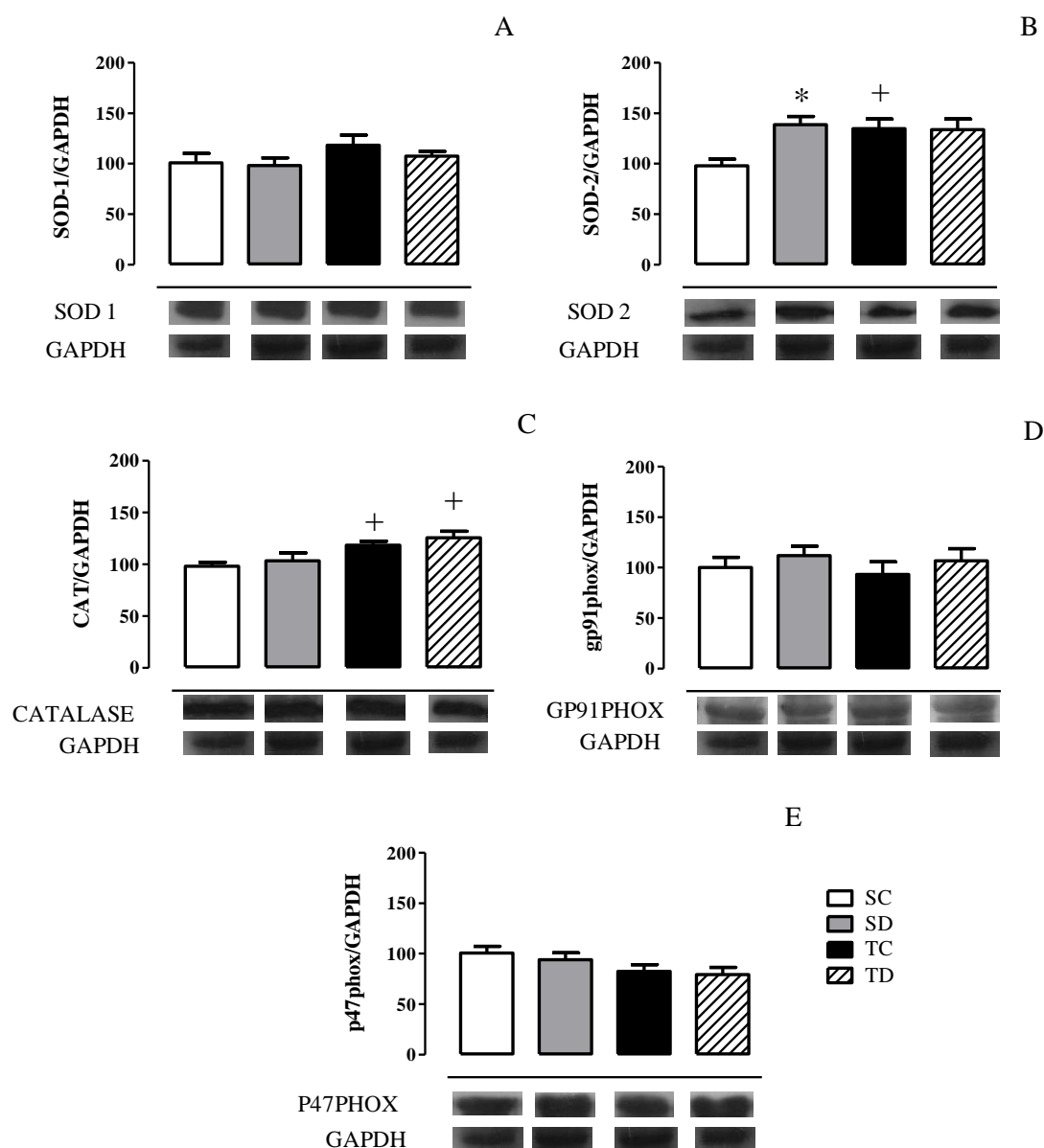
0,2, TD vs SD, Painei E). Pode-se notar que o aumento de gp91phox no TD foi significativamente maior que o aumento observado no grupo TC ( $3,1 \pm 0,3$  mRNA vs  $2,0 \pm 0,2$  mRNA, TD vs TC, Painei D). Não foi encontrada diferença significativa na SOD-1 (Painei A).



**Figura 15:** mRNA da SOD-1 (Painei A), SOD-2 (Painei B), CAT (Painei C), gp91phox (Painei D) e p47phox (Painei E) normalizado por GAPDH no músculo SOL dos grupos sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD). O número de ratos usados para a expressão gênica foi de 9 a 17 por grupo. Significância: \* vs controle, + vs sedentário;  $p < 0,05$ .

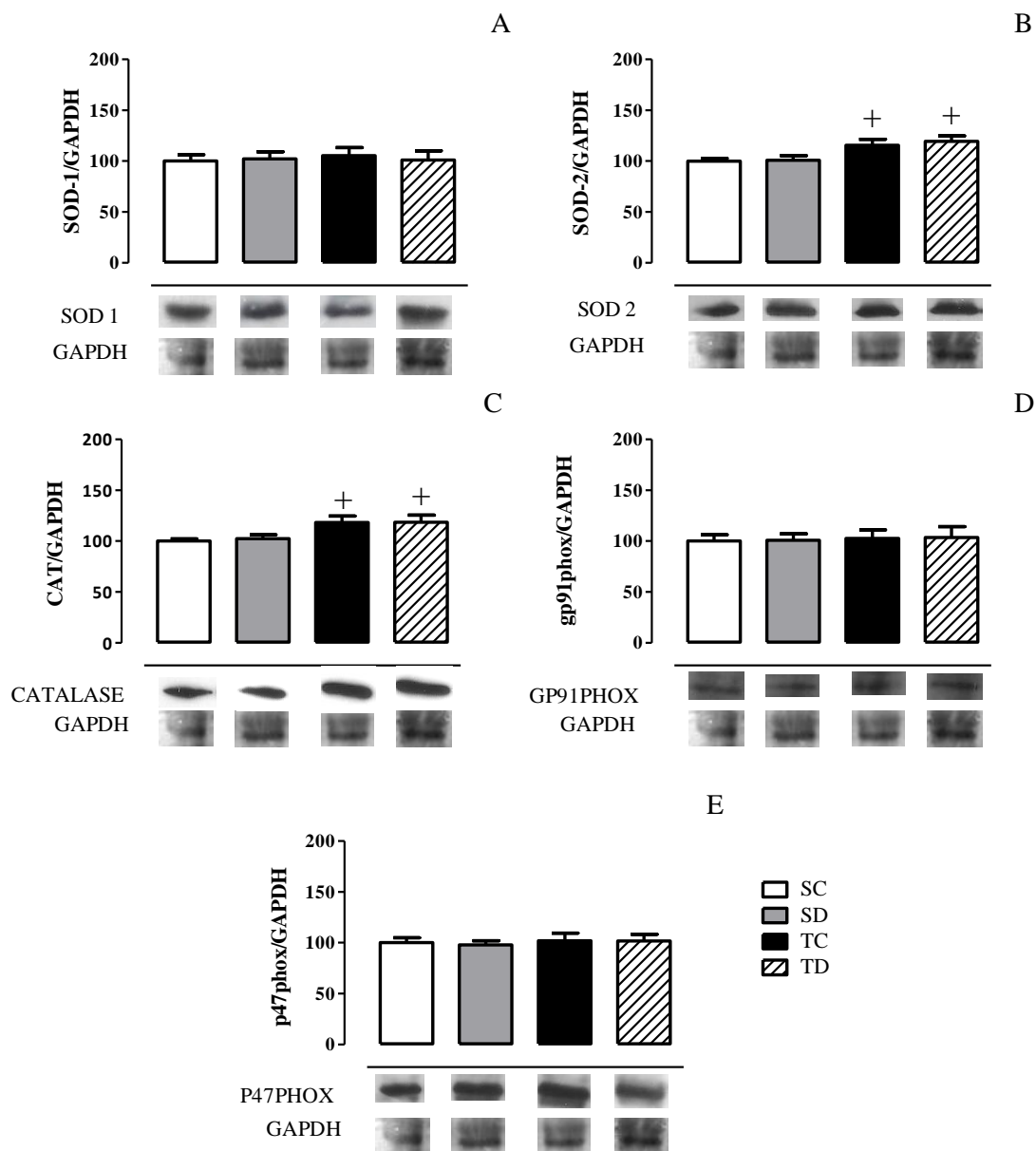
Os resultados da produção proteica desses mesmos alvos para os músculos TA e SOL encontram-se nas Figuras 16 e 17. No músculo TA (Figura 16), observamos que o tratamento com DEX promoveu aumento significativo da SOD-2 no grupo SD ( $138,8 \pm 7,8\%$  vs  $98,0 \pm 6,3\%$ , SD vs SC, Painei B). Enquanto que o TF, além de provocar aumento da SOD-2, no grupo TC, quando comparado a seu respectivo controle

sedentário ( $134,7 \pm 9,5\%$  vs  $98,0 \pm 6,3\%$ , TC vs SC)(Painel B), também acarretou no aumento da catalase, tanto no grupo TC ( $118,5 \pm 3,8\%$  vs  $98,2 \pm 3,7\%$ , TC vs SC)(Painel C), como no grupo TD ( $125,7 \pm 6,2\%$  vs  $103,4 \pm 7,7\%$ , TD vs SD, Painel C) quando comparados aos seus respectivos controles sedentários. Não foi verificada diferença significativa nas proteínas SOD-1, gp91phox e p47phox (Painel A, D e E, respectivamente).



**Figura 16:** Valores das análises quantitativas da produção das proteínas SOD-1 (Painel A), SOD-2 (Painel B), CAT (Painel C), gp91phox (Painel D) e p47phox (Painel E) normalizado por GAPDH no músculo TA dos grupos sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD). O número de ratos usados para a produção proteica foi de 5 a 10 por grupo e os resultados são expressos como % do grupo controle (SC). Significância: \* vs controle, + vs sedentário;  $p < 0,05$ .

Os resultados de produção proteica no músculo SOL podem ser observados na Figura 17. O TF provocou aumento significativo da produção proteica tanto da SOD-2 no grupo TC ( $115,4 \pm 6,0\%$  vs  $100,0 \pm 2,7\%$ , TC vs SC) e no grupo TD ( $119,3 \pm 5,5\%$  vs  $100,7 \pm 4,7\%$ , TD vs SD, Painel B), como da catalase no grupo TC ( $118,2 \pm 6,5$  vs  $100,1 \pm 2,0$ , TC vs SC) e no grupo TD ( $118,6 \pm 6,8\%$  vs  $102,5 \pm 3,6\%$ , TD vs SD, Painel C) quando comparados aos seus controles sedentários. Não foram verificadas diferenças significativas na produção proteica da SOD-1 (Painel A), gp91phox (Painel D) e na p47phox (Painel E).



**Figura 17:** Valores das análises quantitativas da produção das proteínas SOD-1 (Painel A), SOD-2 (Painel B), CAT (Painel C), gp91phox (Painel D) e p47phox (Painel E) normalizado por GAPDH no músculo SOL dos grupos sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD). O número de ratos usados para a produção proteica foi de 6 a 10 por grupo e os resultados são expressos como % do grupo controle (SC). Significância: \* vs controle, + vs sedentário;  $p < 0,05$ .

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo revelam que o tratamento crônico com a DEX promoveu aumento da PA, atrofia muscular e desbalanço autonômico para o coração, acompanhado de aumento de atividade nervosa simpática para os vasos da periferia e

rarefação na microcirculação. Por outro lado, o TF aeróbio, realizado previa e simultaneamente ao tratamento com DEX, foi eficaz em atenuar o aumento da PA, melhorar o balanço autonômico e atenuar a rarefação.

A DEX é um fármaco utilizado amplamente na clínica para diversos fins, dentre eles, como anti-inflamatório, antialérgico, no tratamento de asma, febre reumática, doenças auto-imunes, além de ser utilizado também como antiemético (CARDOSO et al., 2013; MARDANI; BIGDELIAN, 2013; REBEYROL et al., 2012).

Contudo, além de seus efeitos benéficos, seu uso crônico pode acarretar efeitos deletérios como o aumento da PA, redução do peso corporal, atrofia muscular, alterações no metabolismo de lipídios e glicose, resistência à insulina, hiperglicemia, hiperinsulinemia (BAREL et al., 2010; DIONISIO et al., 2014; DODIC et al., 1999; GIOZZET et al., 2008; MACEDO et al., 2014; MONDO et al., 2006; RAFACHO et al., 2007; SCHNEITER; TAPPY, 1998; WEINSTEIN et al., 1998).

Os resultados do presente estudo demonstram que o tratamento com DEX por 14 dias (50µg/kg por dia) determinou aumento tanto da PAS (+12,5%) como da PAD (+11,9%) e PAM (+12,1%) dos animais sedentários tratados. Efeito este, já evidenciado em diversos estudos, tanto em humanos como em animais com diferentes dosagens, períodos e formas de aplicação da DEX (BAREL et al., 2010; ONG et al., 2013; ROY et al., 2009; SUZUKI et al., 1982), inclusive em estudo anterior de nosso laboratório que utilizou o tratamento com DEX por 10 dias na dose de 1000µg/kg (CONSTANTINO, 2014).

Um dos principais objetivos do presente estudo foi investigar se o TF aeróbio, realizado previa e concomitantemente ao tratamento com a DEX, poderia atenuar/prevenir o aumento da PA induzido pela droga. Pode-se observar que o TF promoveu uma atenuação do aumento da PA induzida pelo fármaco, haja vista que o grupo TD apresentou diminuição significativa da PAS (-5,8%), PAD (-12,4%) e PAM (-10,0%) em comparação com o grupo SD. Estes resultados confirmam a eficácia do TF aeróbio em esteira, já evidenciada anteriormente, em atenuar/prevenir o aumento da PA em outros modelos de hipertensão (MASSON et al., 2014; ROQUE et al., 2013). No entanto, até o presente momento, quase nada se sabia sobre os efeitos do TF na hipertensão induzida por DEX. Este resultado reforça a indicação feita pelas grandes Sociedades de Hipertensão, nacionais e internacionais de que o TF aeróbio de baixa/moderada intensidade deve ser utilizado como tratamento coadjuvante para hipertensão arterial (MANCIA et al., 2013; PESCATELLO et al., 2004).

Diversos são os mecanismos citados como envolvidos na HA induzida por DEX, entretanto, o exato mecanismo responsável por esse efeito deletério permanece inconclusivo. Tem sido sugerido que o sistema nervoso central possa estar contribuindo diretamente com a HA induzida pela DEX, uma vez que, injeções bilaterais de DEX no NTS localizado no bulbo (WANG et al., 2005) ou mesmo injeção de corticosterona na parte dorsal do cérebro (SCHEUER et al., 2004) promoveram o aumento da PA e da FC. Da mesma forma, tem sido demonstrado que injeções concomitantes de DEX e de um antagonista do receptor de glicocorticóide no NTS previnem o aumento da PA (WANG et al., 2005).

Outras evidências periféricas sugerem a participação do sistema nervoso autônomo (SNA) no desenvolvimento da HA após tratamento com DEX. Dentre elas pode-se citar o aumento dos receptores adrenérgicos  $\alpha 1B$  em células do músculo liso (SAKAUE; HOFFMAN, 1991), bem como aumento de noradrenalina plasmática (KUMAI et al., 2000) e da concentração de adrenalina (KUMAI et al., 2000; SILVAN et al., 2007; WATANABE et al., 1995) após tratamento com DEX.

A HA resultante da exposição a glicocorticóides no período pré natal parece acontecer tanto em ovelhas (DODIC et al., 1998; DODIC et al., 1999; DODIC et al., 2001) como em ratos (ORTIZ et al., 2003) e tem sido explicada como consequência de alterações no sistema nervoso central. Nesse modelo de hipertensão, o mecanismo envolvido é mais bem estudado e inclui alterações na sensibilidade do barorreflexo (DODIC et al., 1999; SEGAR et al., 2006), alterações essas que parecem estar associadas ao SRA cerebral (DODIC et al., 2002). Em adição, alguns autores sugerem que a exposição a glicocorticóides no período pré natal, além de alterações no barorreflexo, também provoca o aumento do débito cardíaco e da concentração de colágeno no ventrículo esquerdo, o que pode contribuir para a diminuição da função cardíaca (DODIC et al., 1999; DODIC et al., 2001).

Entretanto, apesar dos diversos estudos indicando a correlação entre o aumento da PA induzida pela DEX e alterações no sistema nervoso, o efeito no SNA, logo após um tratamento crônico com DEX em animais adultos, ainda não havia sido investigado.

No presente estudo, foi demonstrado pela primeira vez que, ratos tratados com DEX apresentaram concomitantemente ao aumento da PA, tanto aumento das ondas de BF (+58,5%) como diminuição das ondas de AF (-12,0%), o que representa, respectivamente, aumento da modulação simpática e diminuição da modulação parassimpática para o coração. Ainda, foi verificado aumento significativo da razão



BF/AF (+100%), sugerindo uma disfunção autonômica para o coração, apesar da FC não ter sido alterada. Essas alterações, já foram evidenciadas em outros modelos de hipertensão, especialmente em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (DIAS et al., 2010; MANCIA; GRASSI, 2014; MANCIA et al., 1999). Como mostrado no trabalho de Masson et al. (2014), no qual os SHR apresentaram diminuição da atividade nervosa parassimpática para o coração quando comparados a ratos normotensos.

Além das alterações do SNA para o coração, nesse presente estudo, também foi demonstrado um aumento da modulação simpática para os vasos, o que é representado pelas ondas de BF na variabilidade da PAS (+96,6%). Esta resposta possivelmente pode contribuir para um aumento da resistência vascular periférica (ONG et al., 2009), haja vista que alguns estudos já mostraram que o tratamento com a DEX pode acarretar em aumento da resistência vascular tanto em ratos (GARDINER et al., 1996), em ovelhas (FLETCHER et al., 2002) como em humanos (PIRPIRIS et al., 1992). Estes dados são concordantes com os achados de Masson et al. (2014), que observaram aumento da atividade simpática para os vasos em SHR.

Tanto as alterações encontradas para o coração como para os vasos podem ser possivelmente explicadas pela presença de receptores de glicocorticóides em importantes áreas do controle cardiovascular (SCHEUER et al., 2004).

Por outro lado, ao analisar a influência do TF aeróbio no SNA de ratos tratados com DEX, pode-se observar que o TF foi extremamente efetivo em atenuar todas as alterações induzidas pela DEX, melhorando assim o balanço autonômico para o coração e a atividade simpática para os vasos. Estes resultados inéditos podem sugerir que o SNA seja um dos possíveis mecanismos pelo qual o TF aeróbio possibilitou a atenuação do aumento da PA induzida pela DEX. Efeito benéfico do TF sobre o SNA que já foi evidenciado anteriormente, no entanto, em outros modelos de hipertensão (MASSON et al., 2014) ou de diabetes (HARTHMAN et al., 2007; MOSTARDA et al., 2014).

Esse efeito em modular o SNA desajustado está associado a uma adaptação crônica do TF. Durante as contrações musculares, na sessão de exercício, ocorre um ajuste agudo do TF, denominado de reflexo pressor do exercício. Tanto mecanorreceptores como metaborreceptores, localizados nos músculos esqueléticos, são ativados enviando sinais aferentes para o centro de comando central da PA, com o intuito de modular a regulação rápida da PA, fazendo com que o set point do barorreflexo seja alterado, possibilitando o aumento da FC e da PA para que a demanda metabólica necessária para a realização do exercício seja atingida e assim que o mesmo

possa ser executado (GALLAGHER et al., 2001; KAUFMAN, 2012; MICHELINI et al., 2015). Já, quando o SNA encontra-se alterado devido a patologias como a HA (MASSON et al., 2014), esse reflexo pressor do exercício também mostra-se afetado, podendo auxiliar no aumento da PA (SMITH et al., 2015). Além disso, a hipertensão determina redução da sensibilidade baroreflexa (BRUM et al., 2000). Tem sido demonstrado que a ativação regular desse mecanismo, ou seja, a realização de um programa de TF, é capaz de promover adaptações crônicas que reajustam o reflexo pressor do exercício (MIZUNO et al., 2015) e auxiliam na regulação das alterações no comando central da PA.

Além do sistema nervoso central, as alterações estruturais na microcirculação da musculatura esquelética, que contribuem para o aumento da resistência vascular periférica, também são sugeridas como possíveis mecanismos associados com o aumento da PA induzida pela DEX. Em outros tipos de HA, tem sido observado aumento da razão parede-luz das arteríolas localizadas na musculatura periférica (AMARAL et al., 2000; MELO; MARTINHO; MICHELINI, 2003) e/ou rarefação na microcirculação (AMARAL et al., 2001; AMARAL et al., 2000; COIMBRA et al., 2008; FERNANDES et al., 2012; MELO et al., 2003), no entanto, pouco se sabe sobre suas influências em animais tratados com DEX.

Em relação à rarefação, já foi evidenciada redução no número de vasos tanto *in vitro* como *in vivo* no tratamento/exposição à DEX (BRAUN et al., 2015; MIRABELLI et al., 2014; NAKAO et al., 2012; VOGT; SCHMID-SCHONBEIN, 2001), entretanto, não especificamente na musculatura esquelética.

No presente estudo observou-se que, tanto no músculo TA como no músculo SOL de animais tratados com DEX, houve redução significativa da densidade capilar (-21,9% no TA, -25,9% no SOL) e da razão capilar fibra (-11,1% no TA, -22,2% no SOL).

Vale a pena ressaltar que essa alteração na microcirculação da musculatura esquelética pode ocorrer pela redução de fatores angiogênicos (BAREL et al., 2010; MIRABELLI et al., 2014) e/ou aumento de fatores apoptóticos (BRAUN et al., 2014, JESUS et al., 2015).

A razão parede/luz das arteríolas da musculatura esquelética tem sido sugerida como um grande preditor de aumento de resistência vascular periférica e, portanto, dos aumentos de pressão arterial em outros tipos de HA (AMARAL et al., 2000; MELO et al., 2003). No entanto, o efeito da DEX sobre a estrutura das arteríolas da musculatura

esquelética permanecia desconhecido. Sendo assim, esse foi o primeiro trabalho a mostrar que o aumento da PA induzida por DEX não está associado às alterações significativas da razão parede/luz, bem como, do diâmetro externo, interno ou na espessura das arteríolas localizadas na musculatura esquelética. Talvez o tempo e/ou a dose utilizada de DEX, no presente estudo, não tenham sido suficientes para determinar alterações estruturais nas arteríolas, contudo, pode ser que alterações funcionais estejam relacionadas, uma vez que animais tratados com DEX ou SHR parecem apresentar alterações na reatividade vascular (HERRERA et al., 2010; VELLA et al., 2015). A reatividade vascular não foi verificada neste presente estudo, no entanto, a partir dos resultados de atividade nervosa simpática para os vasos, pode-se hipotetizar que a reatividade dos vasos esteja alterada e, associada à rarefação, pode contribuir para o aumento da PA nestes animais.

Apesar de não haver qualquer alteração na razão parede-luz das arteríolas da musculatura esquelética neste presente estudo, pode-se observar uma correlação negativa e significativa entre a densidade capilar e a PAM no músculo TA, como também correlações significativas entre a densidade capilar ou mesmo a razão capilar fibra e a PAM ou PAD no músculo SOL, sugerindo que essa resposta possa contribuir para o aumento da PA induzido pelo tratamento com DEX.

Ao analisar os efeitos do TF na microcirculação, observa-se que o TF aeróbio foi eficiente em aumentar significativamente a razão capilar-fibra dos grupos controle em ambos os músculos. Além disso, os animais treinados que receberam a DEX não apresentaram redução da densidade capilar nem da razão capilar fibra em ambos os músculos. Estes efeitos do TF já foram verificados em outro modelo de HA após treinamento aeróbio na esteira ou natação (AMARAL; MICHELINI, 2011; FERNANDES et al., 2012), mas não tinham sido demonstrados em HA induzida pela DEX. Esta resposta está associada aos estímulos regulares das sessões de exercício, nos quais tanto a redução da pressão parcial de oxigênio, como o aumento do estresse de cisalhamento (*shear stress*) que pode ocorrer durante o aumento de fluxo sanguíneo, fazem com que as células endoteliais aumentem a expressão do VEGF, proporcionando os ajustes crônicos do organismo de prevenção da rarefação e de angiogênese (AMARAL et al., 2001; AMARAL et al., 2008; AMARAL et al., 2000; FERNANDES et al., 2012). Dados recentes do laboratório (HERRERA et al., *em revisão* e JESUS et al., 2015) demonstraram pela primeira vez que o TF melhora a

microcirculação na musculatura esquelética por evitar o desbalanço que ocorre entre fatores anti e pro-apoptóticos induzidos pela DEX.

Apesar desses efeitos benéficos do TF nos capilares, pode-se observar que o TF não promoveu alteração morfométrica na razão parede-luz de arteríolas localizadas no músculo esquelético de animais dos grupos treinados e tratados com DEX, constatando assim que o TF aeróbio somente possui influência na razão parede-luz de arteríolas que apresentam alguma alteração em sua estrutura, como pode ser observado em outros estudos (AMARAL; MICHELINI, 2011).

Mais recentemente, o estresse oxidativo também vem sendo considerado um possível mecanismo associado com o aumento da PA induzida pela DEX (MONDO et al., 2006; ONG; WHITWORTH, 2011; ROGHAI et al., 2008). Esta associação vem sendo evidenciada pelo aumento da quantidade de EROs (MONDO et al., 2006; ONG et al., 2013) e pela prevenção da HA quando o tratamento com DEX é acompanhado de suplementação com substâncias antioxidantes, tais como tempol, ácido fólico, atorvastatina e ácido alfa-lipóico (MIAO et al., 2007; MONDO et al., 2006; ONG et al., 2013; ZHANG et al., 2004).

Neste presente estudo, o estresse oxidativo também foi avaliado, no entanto, não foi possível encontrar nenhuma diferença significativa entre os grupos. A avaliação do estresse oxidativo foi realizada pela quantidade de EROs nas células endoteliais da aorta, por meio da citometria de fluxo, e pode ser que este método não tenha sido o mais adequado. Assim, outros estudos futuros são necessários para confirmar ou refutar este resultado. Talvez o tempo, a dose e/ou forma de aplicação utilizada no tratamento com DEX ou mesmo o local e/ou forma de avaliação do estresse oxidativo possam ser parâmetros para explicar a não influência do estresse oxidativo encontrada nesse estudo, haja vista que existe grande diversidade desses fatores nos estudos e que diferentes estímulos podem gerar a ativação de variados mecanismos fisiológicos. Mondo et al. (2006) utilizaram a concentração de 0,01 mg/dia, durante 10 dias, injetado de forma subcutânea, enquanto que Roghair et al. (2008) realizaram o tratamento durante 48 horas intravenoso na concentração de 0,28 mg/dia. Já Miao et al. (2007) e Ong et al. (2013) utilizaram também a concentração de 0,01 mg/dia de forma subcutânea, entretanto, durante, respectivamente, 13 e 14 dias. Além disso, os estudos podem apresentar locais de análise diferentes do presente estudo, como o plasma (MIAO et al., 2007; ONG et al., 2013) e diferentes formas de análise do estresse oxidativo, como

através da oxidação dos lipídeos (F-2 isoprostano)(MIAO et al., 2007; ONG et al., 2013).

Outro efeito deletério bastante citado do tratamento com DEX é a redução do peso corporal (BAREL et al., 2010; DIONISIO et al., 2014; KRUG et al., 2015; MACEDO et al., 2014; MACEDO et al., 2016; MONDO et al., 2006; TONOLO et al., 1988). No presente estudo observamos que o tratamento com DEX por 14 dias também acarretou na redução do peso corporal dos animais (-29,1g) após o tratamento com DEX. Assim como observado em trabalhos anteriores, com TF aeróbio contínuo em esteira (BAREL et al., 2010; DIONISIO et al., 2014) ou resistido em escada (KRUG et al., 2015; MACEDO et al., 2014), o TF neste estudo foi ineficaz em prevenir este efeito deletério do fármaco, mesmo que este tenha sido administrado em dosagem bem menor que antes.

Essa redução do peso corporal provocada pela DEX pode ser explicada por dois fatores: uma redução da ingestão alimentar (KRUG et al., 2015; NICASTRO et al., 2012) que se acredita ser uma resposta inicial uma vez que a partir do primeiro dia de DEX os animais comem menos, mas a partir do 10 dia, retornam a alimentação normal (KRUG et al., 2015; MACEDO et al., 2014) e uma redução do peso muscular dos animais, que acontece a partir do terceiro dia e dura durante todo o tratamento (BAREL et al., 2010; GILSON et al., 2007; KRUG et al., 2015; MA et al., 2003; MACEDO et al., 2014; MACEDO et al., 2016). A ingestão alimentar não foi analisada no presente estudo, entretanto a atrofia muscular foi verificada.

Observou-se uma redução significativa na massa muscular do TA nos animais sedentários tratados com DEX (-8,2%), enquanto que no músculo SOL não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os grupos. Estes resultados confirmam os achados anteriores e podem ser explicados pela maior afinidade da DEX por músculos que contém fibras brancas, principalmente pela presença de maiores quantidades de receptores de glicocorticóides (FALDUTO; CZERWINSKI; HICKSON, 1990; NAVA et al., 1996). A atrofia muscular no TA e a ausência de diferença significativa no peso do músculo SOL verificados no presente estudo, ainda foram confirmadas pela análise de secção transversa das fibras (AST) nessas musculaturas, que se apresentou reduzida somente no TA. O TF aeróbio foi ineficaz em reverter a atrofia muscular no TA, haja vista que o grupo treinado e tratado com DEX também apresentou redução no peso muscular quando comparado ao grupo sedentário e tratado com DEX (-6,5%). A ineficiência do TF aeróbio nesse efeito deletério que também já

foi mostrada em estudos anteriores do laboratório que utilizaram o mesmo protocolo de treinamento, contudo, com dose maior de DEX (1000 µg/kg) (BAREL et al, 2010; DIONISIO et al., 2014). Por outro lado, o TF resistido em escada se mostrou eficaz em atenuar a atrofia no músculo FHL de ratos tratados com DEX (KRUG et al., 2015; MACEDO et al., 2014). Da mesma forma, o TF aeróbio foi ineficaz em prevenir a diminuição da AST das fibras no TA. O grupo treinado e tratado com DEX também apresentou redução significativa da AST das fibras do músculo TA (-12,9%), apesar de outro estudo já ter demonstrado que o TF aeróbio, realizado por 8 semanas a 60% da capacidade física máxima, pode ser eficiente em reverter a diminuição da AST no músculo plantar de ratos provocada pela insuficiência cardíaca (CUNHA et al., 2012).

A atrofia muscular induzida pela DEX vem sendo associada a um desbalanço entre as proteínas hipertróficas e atroficas, com predomínio das proteínas atroficas (KRUG et al., 2015; MACEDO et al., 2014; MACEDO et al., 2016) e um dos possíveis mecanismos que pode influenciar neste balanço é o estresse oxidativo (CUNHA et al., 2012; STEINBACHER; ECKL, 2015; SUKHANOV et al., 2011).

Neste sentido foram analisadas as expressões gênicas e produção proteica de duas subunidades do complexo enzimático NADPH oxidase, a gp91phox e a p47phox, bem como, de três enzimas antioxidantes, a SOD-1, SOD-2 e a Catalase nos músculos TA e SOL. Os resultados do PCR em tempo real revelaram que o tratamento com a DEX não acarretou alterações na expressão gênica das subunidades do complexo enzimático (gp91phox e p47phox), bem como da catalase e da SOD-1 no músculo TA. Entretanto, foi observado aumento da expressão da SOD-2 nessa musculatura. Já no músculo SOL, foi observado aumento da Catalase nos animais animais sedentários.

O treinamento físico, em animais controles foi eficiente em aumentar a expressão gênica das enzimas anti-oxidantes SOD-2 no TA e SOL, apesar de determinar também aumento significativo da expressão gênica da subunidade gp91phox no SOL. Nos animais treinados, que receberam o tratamento com DEX, houve diminuição da SOD-1 no TA e aumento da SOD-2 no TA e no SOL. Ainda, o grupo treinado e tratado com DEX apresentou aumento das subunidades gp91phox e p47phox no SOL.

A expressão gênica é o estímulo inicial para a formação de proteína. Ela é controlada por estímulos no DNA que ativam a cópia (momento e intensidade adequados) (transcrição gênica) e o transporte da informação genética através das fitas de RNA mensageiro (mRNA) para o citoplasma, local onde os ribossomos, a partir do código que as fitas são compostas, fabricam as proteínas (FARAH, 2007). Assim, para

ter certeza que tanto as subunidades como enzimas antioxidantes foram, ao final do processo, realmente transcritas em proteínas, realizamos a quantificação proteica pela técnica de Western Blotting.

No músculo TA, observamos que a resposta obtida pela expressão gênica das subunidades gp91phox e p47phox foram mantidas, uma vez que a quantidade de proteína das subunidades da NADPH oxidase também não foi alterada pela DEX. Os animais sedentários tratados com DEX apresentaram aumento de SOD-2 no TA. Já, no músculo SOL, a DEX não determinou nenhuma alteração na produção proteica de nenhum dos fatores analisados. No entanto, o TF determinou aumento da SOD-2 e catalase, em ambos os músculos, confirmando a efetividade do TF em atuar como anti-oxidante. Os animais treinados, que receberam tratamento com DEX, apresentaram capacidade anti-oxidativa aumentada em comparação aos sedentários, também em ambos os músculos.

Recentemente, alguns estudos vem associando o complexo enzimático NADPH oxidase como um dos possíveis responsáveis pela atrofia muscular. Em camundongos com distrofia muscular, houve aumento tanto da expressão gênica das subunidades da NADPH oxidase como aumento da produção de EROs por esse complexo enzimático (WHITEHEAD et al., 2010). Da mesma forma, a atrofia muscular provocada pela insuficiência cardíaca foi associada ao aumento da expressão gênica da subunidade gp91phox e aumento da atividade da NADPH oxidase no músculo plantar (BECHARA, 2012). Para confirmar o envolvimento da NADPH oxidase com a atrofia muscular, estes autores ainda observaram uma atenuação da atrofia após tratamento com apocinina (BECHARA, 2012).

No presente estudo, essa fonte de EROs (NADPH oxidase) parece não estar envolvida com a atrofia muscular induzida por DEX, uma vez que, não foram encontradas diferenças significativas na produção proteica de suas subunidades (gp91phox e p47phox) no músculo atrofiado (TA), ainda que não tenha sido analisada, no presente estudo, a atividade da NADPH oxidase.

O TF também não provocou alteração significativa nas subunidades do complexo enzimático NADPH oxidase nos músculos esqueléticos TA e SOL. Resposta essa que já era esperada, uma vez que, o TF vem se mostrado modulador dessas subunidades quando elas se encontram alteradas. Bechara (2012) demonstrou uma atenuação do aumento da expressão subunidade gp91phox e da diminuição da p47phox no músculo plantar atrofiado de ratos com insuficiência cardíaca, que realizaram TF

aeróbio por 8 semanas. Da mesma forma, Masson et al. (2014) verificaram atenuação do aumento da expressão gênica das subunidades gp91phox e p47phox no núcleo paraventricular de SHR que passaram por um período de TF em esteira também por 8 semanas. Por outro lado, o estudo de Rush et al. (2002) evidenciou diminuição da subunidade p67phox na aorta de porcas que realizaram TF, sem essa subunidade estar alterada por algum fator. Portanto, pode-se observar que os resultados ainda são muito conflitantes e necessitam de maior estudo para sua elucidação.

Já com relação às enzimas antioxidantes, o tratamento com DEX vem proporcionando resultados conflitantes, principalmente porque os tecidos e técnicas para se avaliar o estresse oxidativo são muito diferentes entre um estudo e outro. Enquanto o estudo de Turgay et al. (2012) demonstrou que a DEX provoca diminuição na atividade da enzima Catalase no rim de ratos, Safaeian e Zabolian (2014) verificaram aumento da capacidade antioxidante no plasma, após o tratamento crônico com a DEX. Entretanto, nenhum desses estudos realizou a análise das enzimas antioxidantes na musculatura esquelética. Nesse presente estudo observamos que o tratamento com DEX por 14 dias foi capaz de provocar aumento da produção proteica da SOD-2 no músculo TA, enquanto o SOL não sofreu qualquer alteração em relação à DEX. Pode ser que este aumento de SOD-2 seja uma resposta frente a um possível aumento de EROs pelo tratamento com DEX, mas que não pode ser detectado pela análise que realizamos. Em outro modelo de atrofia, Bechara (2012) observou diminuição da atividade da SOD tanto no músculo SOL como no músculo plantar, ambos atrofiados.

Concordando com nossos resultados, o efeito benéfico do TF na capacidade antioxidante já foi demonstrado anteriormente, em estudos com diferentes modelos de atrofia muscular. Em um modelo de atrofia muscular provocada por insuficiência cardíaca (BECHARA, 2012), o TF determinou atenuação da diminuição da atividade da SOD associada à atrofia muscular nos músculos plantar e SOL. Rush et al. (2002) demonstraram aumento da atividade da SOD-1 na aorta de porcas submetidas a um protocolo de TF e Pereira et al. (1994) observaram aumento na atividade da SOD-2 no SOL e na atividade da Catalase no gastrocnêmico (porção branca) de ratos treinados com natação.

Tem sido demonstrado que a adaptação crônica de aumento da SOD-2 (enzima SOD com manganês – Mn SOD), presente na mitocôndria, parece ser primeiramente responsável pelo aumento da atividade da SOD em geral, enquanto que a SOD-1 (enzima SOD com cobre e zinco – Cu Zn SOD), localizada no citoplasma, parece ser



pouco afetada pelo TF. Além disso, o efeito do TF na atividade da Catalase permanece inconstante e controverso na literatura (GOMES-CABRERA et al., 2015).

Assim, frente aos resultados relacionados com o TF e as enzimas antioxidantes, podemos sugerir que possivelmente o TF possa provocar efeitos benéficos nessa capacidade, entretanto, esse efeito não foi suficiente para atenuar/prevenir a atrofia muscular observada nesse estudo, após tratamento com DEX. Apesar da análise da atividade do complexo enzimático NADPH oxidase não ter sido realizada, bem como dos fatores antioxidantes, os resultados do presente estudo sugerem que outro mecanismo parece estar associado à atrofia muscular induzida pela DEX, principalmente porque o TF aumenta a capacidade antioxidativa, mas não previne a atrofia muscular.

## **6 CONCLUSÃO**

Os resultados do presente estudo revelam que o tratamento crônico com a DEX promoveu aumento da PA, atrofia muscular e desbalanço autonômico para o coração, acompanhado de aumento de atividade nervosa simpática para os vasos da periferia e rarefação na microcirculação. Por outro lado, o TF aeróbio, realizado previa e simultaneamente ao tratamento com DEX, foi eficaz em atenuar o aumento da PA, melhorar o balanço autonômico e atenuar a rarefação. Essa resposta de redução da HA proporcionada pelo TF parece estar associada tanto a uma melhora do balanço autonômico para o coração quanto à diminuição da atividade nervosa simpática para os vasos, bem como a uma melhor capilarização na musculatura esquelética.

Além disso, os resultados sugerem que as alterações na produção e na remoção das EROs parecem não estarem envolvidas com a atrofia muscular provocada pelo tratamento com a DEX, uma vez que o TF aumentou a capacidade antioxidante, mesmo na presença de atrofia muscular.

## 7 REFERÊNCIAS

ADAMS, G. R. et al. Combined isometric, concentric, and eccentric resistance exercise prevents unloading-induced muscle atrophy in rats. **J Appl Physiol** (1985), v. 103, n. 5, p. 1644-54, Nov 2007.

ADAMS, V. et al. Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. **Circulation**, v. 111, n. 5, p. 555-62, Feb 8 2005.

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, Feb 2001.

AMARAL, S. L.; MICHELINI, L. C. Effect of gender on training-induced vascular remodeling in SHR. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 9, p. 814-26, Sep 2011.

AMARAL, S. L. et al. Time course of training-induced microcirculatory changes and of vegf expression in skeletal muscles of spontaneously hypertensive female rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 41, n. 5, p. 424-31, May 2008.

AMARAL, S. L.; ZORN, T. M.; 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, n. 11, p. 1563-72, Nov 2000.

ANTI, S.M.A; GIORGI, R.D.N; CHAHADE, W.H. Antiinflamatórios hormonais: Glicocorticóides. **Einstein**, v.6 (Supl1), p. S159-S65, 2008.

BAREL, M. et al. Exercise training prevents hyperinsulinemia, muscular glycogen loss and muscle atrophy induced by dexamethasone treatment. **Eur J Appl Physiol**, v. 108, n. 5, p. 999-1007, Mar 2010.

BECHARA, L.R.G. Contribuição do complexo enzimático NADPH oxidase na atrofia muscular de ratos infartados: influência do treinamento físico aeróbio, 2012. 146 F. **Tese (Doutorado em Ciências)**, Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

BRAUN, T. et al. Early dexamethasone treatment induces placental apoptosis in sheep. **Reprod Sci**, v. 22, n. 1, p. 47-59, Jan 2015.

BRIONES, A. M.; TOUYZ, R. M. Moderate exercise decreases inflammation and oxidative stress in hypertension: but what are the mechanisms? **Hypertension**, v. 54, n. 6, p. 1206-8, Dec 2009.

BROTMAN, D. J. et al. Effects of short-term glucocorticoids on cardiovascular biomarkers. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 6, p. 3202-8, Jun 2005.

BRUM, P. C. et al. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. **Hypertension**, v. 36, n. 6, p. 1018-22, Dec 2000.

BURGI, K. et al. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity as indicator of sympathetic activity: simultaneous evaluation in different tissues of hypertensive rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 300, n. 2, p. R264-71, Feb 2011.

CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ Res**, v. 87, n. 10, p. 840-4, Nov 10 2000.

CAMPOS, J. C.; GOMES, K. M.; FERREIRA, J. C. Impact of exercise training on redox signaling in cardiovascular diseases. **Food Chem Toxicol**, v. 62, p. 107-19, Dec 2013.

CARDOSO, M. M. et al. Effect of dexamethasone on prevention of postoperative nausea, vomiting and pain after caesarean section: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. **Eur J Anaesthesiol**, v. 30, n. 3, p. 102-5, Mar 2013.

CAVALCANTI, R. A. et al. Low-intensity treadmill exercise-related changes in the rat stellate ganglion neurons. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 6, p. 1334-42, May 1 2009.

COIMBRA, R. et al. Is gender crucial for cardiovascular adjustments induced by exercise training in female spontaneously hypertensive rats? **Hypertension**, v. 52, n. 3, p. 514-21, Sep 2008.

COMBARET, L. et al. Glucocorticoids regulate mRNA levels for subunits of the 19 S regulatory complex of the 26 S proteasome in fast-twitch skeletal muscles. **Biochem J**, v. 378, n. Pt 1, p. 239-46, Feb 15 2004

CONSTANTINO, P. B. Efeito do pré-condicionamento físico na hipertensão induzida pela dexametasona: papel do sistema renina angiotensina, 2014. 70 F. **Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas)**, Programa Interinstitucional de Pós-graduação UNESP/UFSCAR, São Carlos, 2014.

COOPER, C. E. et al. Exercise, free radicals and oxidative stress. **Biochem Soc Trans**, v. 30, n. 2, p. 280-5, Apr 2002.

CUNHA, T. F. et al. Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e41701, 2012.

DAVIES, K. J. et al. Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 107, n. 4, p. 1198-205, Aug 31 1982.

DE KLOET, E. R. et al. Brain mineralocorticoid receptor diversity: functional implications. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 47, n. 1-6, p. 183-90, Dec 1993.

DIAS, D. P. et al. Ovariectomy does not affect the cardiac sympathovagal balance of female SHR but estradiol does. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 10, p. 969-75, Oct 2010.

DIONISIO, T. J. et al. Aerobic training prevents dexamethasone-induced peripheral insulin resistance. **Horm Metab Res**, v. 46, n. 7, p. 484-9, Jun 2014.

DODIC, M. et al. Programming effects of short prenatal exposure to dexamethasone in sheep. **Hypertension**, v. 40, n. 5, p. 729-34, Nov 2002.

DODIC, M. et al. An early prenatal exposure to excess glucocorticoid leads to hypertensive offspring in sheep. **Clin Sci (Lond)**, v. 94, n. 2, p. 149-55, Feb 1998.

DODIC, M. et al. Altered cardiovascular haemodynamics and baroreceptor-heart rate reflex in adult sheep after prenatal exposure to dexamethasone. **Clin Sci (Lond)**, v. 97, n. 1, p. 103-9, Jul 1999.

DODIC, M. et al. Impaired cardiac functional reserve and left ventricular hypertrophy in adult sheep after prenatal dexamethasone exposure. **Circ Res**, v. 89, n. 7, p. 623-9, Sep 28 2001.

DUCHATSCH, F.R.S. Efeitos do tratamento agudo e de curta duração com dexametasona: papel do sistema renina angiotensina e do sistema nervoso autônomo, 2015. **Trabalho de Iniciação Científica, FAPESP**, Bauru, 2015.

ELIAS, L. L. K. et al. Fisiologia da glândula adrenal. In: **AIRES, M. M. Fisiologia**. 3<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p. 1015-1031, 2008.

FALDUTO, M. T.; CZERWINSKI, S. M.; HICKSON, R. C. Glucocorticoid-induced muscle atrophy prevention by exercise in fast-twitch fibers. **J Appl Physiol (1985)**, v. 69, n. 3, p. 1058-62, Sep 1990.

FARAH, S.B. DNA segredos e mistérios. 2 ed. – São Paulo: **Sarvier**, 2007.

FERNANDES, T. et al. Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors: role of microRNAs-16, -21, and -126. **Hypertension**, v. 59, n. 2, p. 513-20, Feb 2012.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-47, Nov 9 2000.

FLETCHER, A. J. et al. Effects of low dose dexamethasone treatment on basal cardiovascular and endocrine function in fetal sheep during late gestation. **J Physiol**, v. 545, n. Pt 2, p. 649-60, Dec 1 2002.

GALLAGHER, K. M. et al. Effects of exercise pressor reflex activation on carotid baroreflex function during exercise in humans. **J Physiol**, v. 533, n. Pt 3, p. 871-80, Jun 15 2001.

GALLEY, H. F.; WEBSTER, N. R. Physiology of the endothelium. **Br J Anaesth**, v. 93, n. 1, p. 105-13, Jul 2004.

GARDINER, S. M. et al. Effects of dexamethasone and SB 209670 on the regional haemodynamic responses to lipopolysaccharide in conscious rats. **Br J Pharmacol**, v. 118, n. 1, p. 141-9, May 1996.

GILSON, H. et al. Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. **Endocrinology**, v. 148, n. 1, p. 452-60, Jan 2007.

GIOZZET, V. A. et al. Dexamethasone treatment in vivo counteracts the functional pancreatic islet alterations caused by malnourishment in rats. **Metabolism**, v. 57, n. 5, p. 617-24, May 2008.

GOMES-CABRERA, M.; DOMENECH, E.; VINA, J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. **Free radical biology and medicine**, 44: 126-131, 2008.

GUARINO, N.; SHIMA, H.; PURI, P. Cardiac gene expression and synthesis of atrial natriuretic peptide in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia in rats: effect of prenatal dexamethazone treatment. **J Pediatr Surg**, v. 36, n. 10, p. 1497-501, Oct 2001.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 12ª Ed.; Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2011.

HARTHMAN, A. D. et al. Exercise training improves arterial baro- and chemoreflex in control and diabetic rats. **Auton Neurosci**, v. 133, n. 2, p. 115-20, May 30 2007.

HERRERA, E. A. et al. Antioxidant treatment alters peripheral vascular dysfunction induced by postnatal glucocorticoid therapy in rats. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9250, 2010.

HERRERA, N. A. et al. Exercise training attenuates dexamethasone-induced hypertension by improving autonomic balance to the heart, sympathetic vascular modulation and skeletal muscle microcirculation. **Journal of Hypertension**, em revisão.

HIGA-TANIGUCHI, K. T. et al. Exercise training-induced remodeling of paraventricular nucleus (nor)adrenergic innervation in normotensive and hypertensive rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, n. 4, p. R1717-27, Apr 2007.

HU, L. et al. Apocynin but not L-arginine prevents and reverses dexamethasone-induced hypertension in the rat. **Am J Hypertens**, v. 19, n. 4, p. 413-8, Apr 2006.

JESUS, I. et al. Pré condicionamento físico previne alterações no balanço entre fatores angiogênico e apoptóticos causados pela dexametasona. In: XXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Hipertensão, 2015, Rio de Janeiro. **Revista Hipertensão**, 2015, v.2, p. 129.

KAUFMAN, M. P. The exercise pressor reflex in animals. **Exp Physiol**, v. 97, n. 1, p. 51-8, Jan 2012.

KIRWAN, JR. Systemic corticosteroids in rheumatology. In: Klippel J. Dieppe PA, editors. **Rheumatology**. 2<sup>a</sup> Ed. London: Mosby; v.1, p. 1-6, 1998.

KRUG, A. L. et al. High-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy. **Muscle Nerve**, Sep 10 2015.

KUMAI, T. et al. Involvement of tyrosine hydroxylase up regulation in dexamethasone-induced hypertension of rats. **Life Sci**, v. 67, n. 16, p. 1993-9, Sep 8 2000.

LANGEN, R. C. et al. Triggers and mechanisms of skeletal muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 45, n. 10, p. 2245-56, Oct 2013.

LEGER, B. et al. Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **J Physiol**, v. 576, n. Pt 3, p. 923-33, Nov 1 2006.

LEWIS, M. I. et al. Influence of varying degrees of malnutrition on IGF-I expression in the rat diaphragm. **J Appl Physiol (1985)**, v. 95, n. 2, p. 555-62, Aug 2003.

LIU, C. et al. Inhibition of dehydration-induced water intake by glucocorticoids is associated with activation of hypothalamic natriuretic peptide receptor-A in rat. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15607, 2010.

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, Aug 2003.

MACEDO, A. G. et al. Low-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced atrophy in the flexor hallucis longus muscle. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 143, p. 357-64, Sep 2014.

MACEDO, A. G. et al. Time-course changes of catabolic proteins following muscle atrophy induced by dexamethasone. **Steroids**, v. 107, p. 30-6, Mar 2016.

MANCIA, G. et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). **J Hypertens**, v. 31, n. 7, p. 1281-357, Jul 2013.

MANCIA, G.; GRASSI, G. The autonomic nervous system and hypertension. **Circ Res**, v. 114, n. 11, p. 1804-14, May 23 2014.

MANCIA, G. et al. Sympathetic activation in the pathogenesis of hypertension and progression of organ damage. **Hypertension**, v. 34, n. 4 Pt 2, p. 724-8, Oct 1999.

MARDANI, D.; BIGDELIAN, H. Prophylaxis of dexamethasone protects patients from further post-operative delirium after cardiac surgery: A randomized trial. **J Res Med Sci**, v. 18, n. 2, p. 137-43, Feb 2013.

MARTINEZ, D. G. et al. Effects of long-term exercise training on autonomic control in myocardial infarction patients. **Hypertension**, v. 58, n. 6, p. 1049-56, Dec 2011.

MASSON, G. S. et al. Time-dependent effects of training on cardiovascular control in spontaneously hypertensive rats: role for brain oxidative stress and inflammation and baroreflex sensitivity. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e94927, 2014.

MELO, R. M.; 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, n. 4, p. 851-7, Oct 2003.

MIAO, Y. et al. Folic acid prevents and partially reverses glucocorticoid-induced hypertension in the rat. **Am J Hypertens**, v. 20, n. 3, p. 304-10, Mar 2007.

MICHELINI, L. C. et al. Neural control of circulation and exercise: a translational approach disclosing interactions between central command, arterial baroreflex, and muscle metaboreflex. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 309, n. 3, p. H381-92, Aug 1 2015.

MIRABELLI, P. et al. Early effects of dexamethasone and anti-VEGF therapy in an inflammatory corneal neovascularization model. **Exp Eye Res**, v. 125, p. 118-27, Aug 2014.

MIZUNO, M. et al. Dynamic exercise training prevents exercise pressor reflex overactivity in spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 309, n. 5, p. H762-70, Sep 2015.

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. 1029-34, Nov 2006.

MOSTARDA, C. T. et al. Low intensity resistance training improves systolic function and cardiovascular autonomic control in diabetic rats. **J Diabetes Complications**, v. 28, n. 3, p. 273-8, May-Jun 2014.

MOURA, S. A. et al. Local drug delivery system: inhibition of inflammatory angiogenesis in a murine sponge model by dexamethasone-loaded polyurethane implants. **J Pharm Sci**, v. 100, n. 7, p. 2886-95, Jul 2011.

NAKAO, S. et al. Larger therapeutic window for steroid versus VEGF-A inhibitor in inflammatory angiogenesis: surprisingly similar impact on leukocyte infiltration. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 53, n. 7, p. 3296-302, Jun 2012.

NAVA, S. et al. Effects of acute steroid administration on ventilatory and peripheral muscles in rats. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 153, n. 6 Pt 1, p. 1888-96, Jun 1996.



NICASTRO, H. et al. Effects of leucine supplementation and resistance exercise on dexamethasone-induced muscle atrophy and insulin resistance in rats. **Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 465-71, Apr 2012.

ONG, S. L. et al. The effect of alpha-lipoic acid on mitochondrial superoxide and glucocorticoid-induced hypertension. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2013, p. 517045, 2013.

ONG, S. L.; WHITWORTH, J. A. How do glucocorticoids cause hypertension: role of nitric oxide deficiency, oxidative stress, and eicosanoids. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 40, n. 2, p. 393-407, ix, Jun 2011.

ONG, S. L. et al. Hemodynamics of dexamethasone-induced hypertension in the rat. **Hypertens Res**, v. 32, n. 10, p. 889-94, Oct 2009.

ONG, S. L. H. Role of xanthine oxidase in dexamethasone-induced hypertension in rats. **Clinical and experimental pharmacology and physiology**. 34:517-519, 2007.

ORTIZ, L. A. et al. Prenatal dexamethasone programs hypertension and renal injury in the rat. **Hypertension**, v. 41, n. 2, p. 328-34, Feb 2003.

PEREIRA, B. et al. Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in muscle and lymphoid organs of sedentary and exercise-trained rats. **Physiology and Behavior**, 94, 1994.

PESCATELLO, L. S. et al. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. **Med Sci Sports Exerc**, v. 36, n. 3, p. 533-53, Mar 2004.

PIRPIRIS, M. et al. Pressor responsiveness in corticosteroid-induced hypertension in humans. **Hypertension**, v. 19, n. 6 Pt 1, p. 567-74, Jun 1992.

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, n. 5, p. 536-45, May 2007.

REBEYROL, C. et al. Glucocorticoids reduce inflammation in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. **Cell Signal**, v. 24, n. 5, p. 1093-9, May 2012.

ROGHAIR, R. D. et al. Coronary constriction to angiotensin II is enhanced by endothelial superoxide production in sheep programmed by dexamethasone. **Pediatr Res**, v. 63, n. 4, p. 370-4, Apr 2008.

ROQUE, F. R. et al. Aerobic exercise reduces oxidative stress and improves vascular changes of small mesenteric and coronary arteries in hypertension. **Br J Pharmacol**, v. 168, n. 3, p. 686-703, Feb 2013.

ROY, S. G. et al. Excess of glucocorticoid induces cardiac dysfunction via activating angiotensin II pathway. **Cell Physiol Biochem**, v. 24, n. 1-2, p. 1-10, 2009.

RUSH, J. W.; FORD, R. J. Nitric oxide, oxidative stress and vascular endothelium in health and hypertension. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 37, n. 1-2, p. 185-92, 2007.

RUSH, J. W.; TURK, J. R.; LAUGHLIN, M. H. Exercise Training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcines aortic endothelium. **American Journal Physiol Heart Circ Physiology**, 284:1387, 2002.

SAFAEIAN, L.; ZABOLIN, H. Antioxidant effects of bovine lactoferrin on dexamethasone-induced hypertension in rat. **ISRN Pharmacology**, 2014.

SAKAUE, M.; HOFFMAN, B. B. Glucocorticoids induce transcription and expression of the alpha 1B adrenergic receptor gene in DTT1 MF-2 smooth muscle cells. **J Clin Invest**, v. 88, n. 2, p. 385-9, Aug 1991.

SCHAFFER, S. C. et al. Dexamethasone suppresses eNOS and CAT-1 and induces oxidative stress in mouse resistance arterioles. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 288, n. 1, p. H436-44, Jan 2005.

SCHEUER, D. A. et al. Glucocorticoids act in the dorsal hindbrain to increase arterial pressure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 286, n. 1, p. H458-67, Jan 2004.

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, Nov 1998.

SEGAR, J. L. et al. Early gestation dexamethasone alters baroreflex and vascular responses in newborn lambs before hypertension. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 291, n. 2, p. R481-8, Aug 2006.

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, Aug 2002.

SHELAT, S. G.; FLANAGAN-CATO, L. M.; FLUHARTY, S. J. Glucocorticoid and mineralocorticoid regulation of angiotensin II type 1 receptor binding and inositol triphosphate formation in WB cells. **J Endocrinol**, v. 162, n. 3, p. 381-91, Sep 1999.

SILVA, A. S. et al. Cardiovascular and autonomic alterations in rats with Parkinsonism induced by 6-OHDA and treated with L-DOPA. **Life Sci**, v. 127, p. 82-9, Apr 15 2015.

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.

SILVAN, G. et al. The effect of long-term exposure to combinations of growth promoters in Long Evans rats: part 1: Endocrine adrenal function. **Anal Chim Acta**, v. 586, n. 1-2, p. 246-51, Mar 14 2007.

SMITH, S. A. et al. Muscle mechanoreflex overactivity in hypertension: a role for centrally-derived nitric oxide. **Auton Neurosci**, v. 188, p. 58-63, Mar 2015.

STEINBACHER, P.; ECKL, P. Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 356-77, 2015.

SUDHIR, K. et al. Hydrocortisone-induced hypertension in humans: pressor responsiveness and sympathetic function. **Hypertension**, v. 13, n. 5, p. 416-21, May 1989.

SUKHANOV, S. et al. Angiotensin II, oxidative stress and skeletal muscle wasting. **Am J Med Sci**, v. 342, n. 2, p. 143-7, Aug 2011.

SUZUKI, H. et al. Role of renin-angiotensin system in glucocorticoid hypertension in rats. **Am J Physiol**, v. 243, n. 1, p. E48-51, Jul 1982.

THIDA, M. et al. Effects of sepiapterin supplementation and NOS inhibition on glucocorticoid-induced hypertension. **Am J Hypertens**, v. 23, n. 5, p. 569-74, May 2010.

TONOLO, G. et al. Chronic low-dose infusions of dexamethasone in rats: effects on blood pressure, body weight and plasma atrial natriuretic peptide. **J Hypertens**, v. 6, n. 1, p. 25-31, Jan 1988.

TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? **Hypertension**, v. 44, n. 3, p. 248-52, Sep 2004.

TULIPANO, G. et al. Glucocorticoid inhibition of growth in rats: partial reversal with the full-length ghrelin analog BIM-28125. **Pituitary**, v. 10, n. 3, p. 267-74, 2007.

TURGAY, M. et al. The effects of dexamethasone on oxidant/antioxidant status in kidneys of rats administered mercuric chloride. **Journal Citation Reports**, 113(1)10-13, 2012.

VELLA, R. K. et al. Resveratrol prevents cardiovascular complications in the SHR/STZ rat by reductions in oxidative stress and inflammation. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 918123, 2015.

VOGT, C. J.; SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Microvascular endothelial cell death and rarefaction in the glucocorticoid-induced hypertensive rat. **Microcirculation**, v. 8, n. 2, p. 129-39, Apr 2001.

WANG, L. L.; OU, C. C.; CHAN, J. Y. Receptor-independent activation of GABAergic neurotransmission and receptor-dependent nontranscriptional activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway in short-term cardiovascular actions of dexamethasone at the nucleus tractus solitarii of the rat. **Mol Pharmacol**, v. 67, n. 2, p. 489-98, Feb 2005.

WATANABE, T. et al. Effect of dexamethasone on plasma free dopamine: dopaminergic modulation in hypertensive patients. **Hypertens Res**, v. 18 Suppl 1, p. S197-8, Jun 1995.

WEINSTEIN, S. P. et al. Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of GLUT4 to the cell surface in rat skeletal muscle. **Metabolism**, v. 47, n. 1, p. 3-6, Jan 1998.

WHITEHEAD, N. P. et al. Skeletal muscle NADPH oxidase is increased and triggers stretch-induced damage in the mdx mouse. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15354, 2010.

WRIGHT, A. P. et al. Structure and function of the glucocorticoid receptor. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 47, n. 1-6, p. 11-9, Dec 1993.

ZHANG, Y. et al. The antioxidant tempol prevents and partially reverses dexamethasone-induced hypertension in the rat. **Am J Hypertens**, v. 17, n. 3, p. 260-5, Mar 2004.

ZHANG, Y.; MIAO, Y.; WHITWORTH, J. A. Aspirin prevents and partially reverses adrenocorticotrophic hormone-induced hypertension in the rat. **Am J Hypertens**, v. 20, n. 11, p. 1222-8, Nov 2007.

## ANEXO 1



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



## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - FC/UNESP BAURU

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Efeitos do treinamento físico na hipertensão e no estresse oxidativo em ratos tratados com dexametasona**", (processo nº **1436/2014 Vol. 1 - CEUA/FC**), sob a responsabilidade da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. SANDRA LIA DO AMARAL CARDOSO, está de acordo com a legislação (Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008), com as resoluções normativas aplicáveis e à luz dos Princípios Éticos de Experimentação Animal elaborados pelo CONCEA, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, em reunião de 26 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini

*Presidente da CEUA*