

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

Papel do treinamento físico aeróbio na modulação do balanço pró e anti-angiogênico no músculo esquelético de ratos Wistar tratados com dexametasona

Aluno: Isley de Jesus
Orientadora: Prof^a. Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso

São Carlos
Março – 2016

Isley de Jesus

Papel do treinamento físico aeróbio na modulação do balanço pró e anti-angiogênico no músculo esquelético de ratos Wistar 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 parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. 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)

J58p Jesus, Isley de
Papel do treinamento físico aeróbio na modulação do balanço pró e antiangiogênico no músculo esquelético de ratos Wistar tratados com dexametasona / Isley de Jesus. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
48 p.

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

1. Glicocorticoides. 2. Densidade de vasos. 3. Treinamento físico aeróbio. 4. Hipertensão. I. Título.

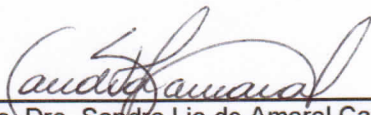


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

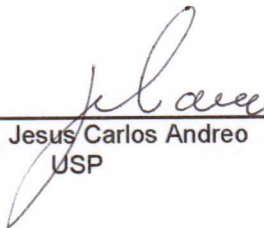
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Isley de Jesus, realizada em 28/03/2016:



Profa. Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso
UNESP



Prof. Dr. Anderson Saranz Zago
UNESP



Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo
USP

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha mãe por sempre me mostrar que o conhecimento é a nossa maior riqueza e ninguém pode nos tirar; a minha família que é a base; minha esposa Lauriane, que mudou minha vida e também a minha nova família francesa. E por fim, à pessoa que me abriu as portas para o mundo da pesquisa, professora Sandra, sempre serei grato pela oportunidade.

Agradecimentos

À CAPES e FAPESP.

Agradeço aos meus colegas de trabalho do LEFEx (Naiara, Mayara, André, Macedo, Paula, Vinicius, Francine, Léo, Tosi e a novata Dani). Obrigado a todos, cada um de certa forma contribuiu para o meu sucesso.

Ao pessoal da Anatomia da USP, por nos apoiar com as análises histológicas (Shino, Mizael e professor Jesus).

Ao Alexandre da secretaria do programa de pós-graduação PIPGCF, USCar/UNESP.

A todos os professores que ministraram disciplinas durante este mestrado.

A minha irmã, por sempre se preocupar e me ajudar com o que fosse necessário.

Ao meu brother e ex-vizinho de Kitinet Rafael.

Ao Léo pela amizade e parceria nos momentos em que mais precisei.

Aos meus amigos e quase irmãos da república Minha Tia e também aos amigos da república Lado Podre, onde me sentia em casa.

Meu grande amigo Juba.

Minhas amigas Daia, Thaisa, Mel, Mirela, Silvinha e Thyssen.

Galera do fundão do Busão na época da graduação.

Mais uma vez a professora Sandra por me ensinar a pescar o peixe ao invés de me dar. Uma excelente pessoa e uma excepcional profissional, foi uma honra fazer parte de seu grupo de pesquisa, aprendi e evoluí muito.

A minha esposa Lauriane que sempre está ao meu lado me apoiando, mesmo morando longe um do outro, obrigado pela paciência e cumplicidade.

Lista de Figuras

- Figura 1. Demonstração esquemática das vias de ativação angiogênica e apoptótica. Adaptado de (Roy *et al.*, 2006; Grivicich *et al.*, 2007; Sanz *et al.*, 2008)..... 15
- Figura 2. Linha do tempo experimental. Teste de esforço máximo (TEM), peso corporal (PC)..... 22
- Figura 3. Peso corporal (PC) após as 8 semanas de treinamento físico (A) para sedentários (n = 26) e treinados (n = 34) e após 14 dias de tratamento com DEX (B) em todos os grupos analisados. Controle sedentário (SC, n = 13), sedentário tratado com DEX (SD, n = 13), treinado controle (TC, n = 19) e treinado e tratado com DEX (TD, n = 15). Significância: * controle vs, + vs sedentários, $p < 0,05$ 26
- Figura 4. Capacidade física máxima expressa pelo tempo de corrida (s) na esteira para sedentários (n = 26) e treinados (n = 34). Significância: + vs sedentários, $p < 0,05$. . 27
- Figura 5. Secções transversas do músculo SOL, coradas com hematoxilina-eosina, representativas de um rato de cada grupo, sedentário controle (SC), sedentário tratado com DEX (SD), treinado controle (TC) e treinado e tratado com DEX (TD). Círculos amarelos indicam a área da fibra muscular. Aumento de 20X, a barra representa 100 μ m. 29
- Figura 6. Secções transversas do músculo TA, coradas com hematoxilina-eosina, representativas de um rato de cada grupo, sedentário controle (SC), sedentário tratado com DEX (SD), treinado controle (TC) e treinado e tratado com DEX (TD). Círculos amarelos indicam a área da fibra muscular. Aumento de 20X, a barra representa 100 μ m. 29
- Figura 7. Análise densitométrica da área secção transversa das fibras do músculo SOL (7A) e TA (7B) em todos os grupos analisados: controle sedentário (SC, n = 7), sedentário tratado com DEX (SD, n = 9), treinado controle (TC, n = 9) e treinado e tratado com DEX (TD, n = 8). Significância: * vs controle e + vs sedentário, $p < 0,05$ 30
- Figura 8. Secções transversas do músculo SOL, corado com hematoxilina-eosina, foto tirada de um rato de cada grupo, sedentário controle (SC), sedentário tratado com DEX (SD), treinado controle (TC) e treinado e tratado com DEX (TD). Setas amarelas indicam o capilar. Aumento de 20X, a barra representa 100 μ m. 31
- Figura 9. Secções transversas do músculo TA, corado com hematoxilina-eosina, foto tirada de um rato de cada grupo, sedentário controle (SC), sedentário tratado com DEX (SD), treinado controle (TC) e treinado e tratado com DEX (TD). Setas amarelas indicam o capilar. Aumento de 20X, a barra representa 100 μ m. 31
- Figura 10. Razão capilar/fibra (C/F) para (A) e a densidade capilar (DC) (B) no músculo SOL em todos os grupos analisados: controle sedentário (SC, n = 7), sedentário tratado com DEX (SD, n = 9), treinado controle (TC, n = 9) e treinado e

tratado com DEX (TD, n = 8). Significância: * vs controle e + vs sedentários, p < 0,05.
..... 32

Figura 11. Razão capilar/fibra (C/F) para (A) e a densidade capilar (DC) (B) no músculo TA em todos os grupos analisados: controle sedentário (SC) (n = 7), sedentário tratado com DEX (SD) (n = 9), treinado controle (TC) (n = 9) e treinado e tratado com DEX (TD) (n = 8). Significância: * controle vs e + vs sedentários, p < 0,05..... 33

Figura 12. Análises quantitativas e géis representativos da produção proteica utilizando a técnica de Western blotting: Receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-2, A), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, B), proteína 2 de linfoma de célula B (Bcl-2, C), assassino 1 antagonista de BCL-2 (Bax, D), razão Bcl-2/Bax (E), razão p-Bax/Bax (F) e caspase-3 clivada (G). Concentração de 50µg de proteína do músculo SOL (8-10 ratos). Sedentário controle (SC), sedentário tratado com DEX (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com DEX (TD). Valores são expressos como % do controle. Significância: * vs controle e + vs sedentário, p < 0,05.
..... 34

Figura 13. Análises quantitativas e géis representativos da produção proteica utilizando a técnica de Western blotting: Receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-2, A), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, B), ciclooxigenase-2 (COX-2, C), proteína 2 de linfoma de célula B (Bcl-2, D), assassino 1 antagonista de BCL-2 (Bax, E), razão Bcl-2/Bax (F), razão p-Bax/Bax (G) e caspase-3 clivada (H). Concentração de 50µg de proteína do músculo TA (n=8-10). Sedentário controle (SC), sedentário tratado com DEX (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com DEX (TD). Valores são expressos como % do controle. Significância: * vs controle e + vs sedentário, p < 0,05..... 35

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores de massa muscular e glândula adrenal normalizados pela tíbia nos diferentes grupos analisados.	28
Tabela 2. Parâmetros hemodinâmicos em todos os grupos analisados.....	36
Legenda da tabela 1: Pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), significa pressão arterial (PAM) e a frequência cardíaca (FC) (n=9-10). Significância: * controle vs e + vs sedentários, $p < 0,05$	36

Lista de abreviações

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico	HE - Hematoxilina e eosina
APAF-1 - Apoptossomo-1	IP₃ -Inositol 1,4,5-trifosfato
AST - Área de secção transversa	KDR - Receptor domínio kinase
Bad - Promotor de morte associada à BCL-2	NaCl - Cloreto de sódio
Bak -Antagonista/assassino homólogo	NO - óxido nítrico
Bax -Assassino 1 antagonista de BCL-2	NOS - óxido nítrico sintase
Bcl-2 - Proteína 2 de linfoma de célula B	PA - Pressão arterial
Bcl-x₂ -Proteína x associada ao BCL-2	PAD - Pressão arterial diastólica
BCL-XL - Linfoma 2 de célula B de leucemia linfóide crônica	PAM - Pressão arterial média
Bid - Domínio de homologia ao BCL-2	PAS - Pressão arterial sistólica
BSA - Albumina sérica bovina	PGE₂ - Prostaglandina E2
COX-1 and COX-2 - Ciclooxigenase-1 and -2	PI3K/Akt - Fosfoinosítideo 3 quinase/proteína quinase B
CRH - Hormônio corticotrofina	Pic - Coquetel de inibidores de proteases
DAG -Diacilglicerol	PLC - Fosfolipase C
DC - Densidade capilar	PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
DEX -Dexametasona	Razão C/F – Razão capilar/fibra
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético	RTK - Receptor de tirosina quinase
eNOS -Óxido nítrico sintase endotelial	SC - Sedentário controle
EP₂ and EP₄ - Receptor de prostaglandina	SD - Sedentário tratado com DEX
EROS - Espécies reativas do oxigênio	SOL -Sóleo
FC - Frequência cardíaca	TA - Tibial anterior
Flk-1 -Kinase do fígado fetal	TC - Treinado controle
Flt-1 -Kinase tirosina como fms	TD - Treinado e tratado com DEX
GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	TEM - Teste de esforço máximo
GC - Glicocorticoides	TF – treinamento físico
HA - Hipertensão arterial	VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular
HCl -Hidroclorito de sódio	VEGFR-2 - Receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular

Resumo

A dexametasona (DEX) é amplamente utilizada em vários casos clínicos devido a sua eficácia como fármaco anti-inflamatório. Por outro lado, a utilização crônica deste medicamento pode causar alterações metabólicas e hemodinâmicas que contribuem para o desenvolvimento da hipertensão. A hipertensão arterial pode ser determinada pelo aumento no débito cardíaco ou da resistência periférica e a rarefação pode estar associada a esta resposta. A manutenção da microcirculação é dependente do equilíbrio entre proteínas anti e apoptóticas e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) contribui para a manutenção deste equilíbrio. Demonstramos recentemente que altas doses de DEX reduzem a produção do VEGF, no entanto, os mecanismos envolvidos nesta resposta não foram avaliados. Por outro lado, tem sido mostrado que o treinamento físico (TF) aeróbio é uma ferramenta importante na prevenção da rarefação e/ou promoção angiogênese, no tratamento da hipertensão, no entanto, quase nada se sabe sobre os efeitos do TF na microcirculação e hipertensão induzida pela DEX. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar se o tratamento crônico com DEX compromete a densidade de vasos por alterar o balanço angiogênico/apoptótico na musculatura esquelética e se o pré-condicionamento físico aeróbio atenua esta resposta. Para isso, 60 ratos wistar foram submetidos a um protocolo de TF aeróbio na esteira ou mantidos sedentários por 8 semanas. Além disso, os animais foram tratados com DEX ou salina (50µg/kg, *s.c.* por 14 dias). Os grupos foram separados em: sedentário controle (SC), sedentário e tratado com DEX (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com DEX (TD). O peso corporal (PC) e a pressão arterial (PA) foram analisados. Após a eutanásia, a glândula adrenal, miocárdio e os músculos SOL e TA foram pesados e normalizados pela tibia. Foram avaliados também, área de secção transversa (AST), razão capilar/fibra (C/F), densidade capilar (DC) e análise da produção proteica dos músculos SOL e TA. O tratamento com DEX causou redução tanto no PC quanto no peso muscular do TA, assim como da AST. Além disso, a DEX reduziu significativamente C/F e DC nos músculos (-41 e -43%, SOL) e (-30 e 68,6%, TA). Por outro lado, o TF aeróbio preveniu a redução da C/F e DC causado pela DEX (72,7 e 81,0%, SOL) e (32,9 e 54,2%, TA). Já, os níveis proteicos no SOL e TA foram reduzidos significativamente pela DEX: VEGFR-2 (-14,6% e -20,1%), VEGF (-15,6 e -19%), Bcl-2 (-18,4 e -20,5%), razão Bcl-2/Bax (-29,0 e -13,7%) e p-Bax/Bax (-25,4 e -20%), além da COX-2 no TA (-22,8%). A caspase-3 clivada estava aumentada (16,0 e 17,8%, SOL e TA respectivamente). Em contrapartida, o TF aeróbio foi capaz de prevenir a redução dos níveis proteicos causado pela DEX nos músculos SOL e TA, além de prevenir o aumento da caspase-3 clivada. Em conclusão, os resultados deste presente estudo mostrou que a rarefação induzida DEX ocorreu por promover o desbalanço entre fatores angiogênicos e apoptóticos, sendo esse um dos possíveis mecanismos da hipertensão, no entanto, demonstrou que o TF aeróbio é uma boa estratégia para manter o balanço entre fatores angiogênicos e apoptóticos, o qual contribui para a manutenção da microcirculação na musculatura esquelética e, portanto, pode contribuir para a atenuação da hipertensão induzida pela DEX.

Palavras chave: Glicocorticoides, densidade de vasos, treinamento físico aeróbio, hipertensão.

Abstract

Dexamethasone (DEX) is widely used in clinic due to its effectiveness as anti-inflammatory. Nevertheless, its chronic use may cause unwanted metabolic and hemodynamic alterations, which contribute for the development of hypertension. Arterial hypertension may be determined by increases in cardiac output or peripheral resistance and rarefaction may be associated with this response. Microcirculation maintenance is dependent on the balance between anti-apoptotic and apoptotic proteins and vascular endothelial growth factor (VEGF), known to be a key-regulator protein of the physiological angiogenesis, helps to maintain this balance. We recently demonstrated that high doses with DEX-treatment reduce VEGF protein levels, but the mechanisms involved in this response were not evaluated. In the other hand, it has been shown that aerobic training (T) is a good strategy in preventing rarefaction and/or stimulating angiogenesis, however almost nothing is known about the effects of T on microcirculation and hypertension induced by DEX. Therefore, the aim of this study was to investigate the mechanisms induced by T that can contribute to attenuate DEX-induced rarefaction. Wistar rats were subjected to an aerobic exercise protocol on the treadmill or kept sedentary for 8 weeks. Additionally, animals were treated with DEX or saline (50µg/kg, *s.c.* for 14 days). Groups were: sedentary control (SC), DEX sedentary (SD), trained control (TC) and trained DEX (TD). Body weight (BW) and arterial pressure (AP) were analyzed. After euthanasia, adrenal gland, myocardium, SOL and TA muscles were weighted and normalized by tibia. The cross-sectional area (CSA), capillary: fiber ratio (C:F ratio), capillary density (CD) and protein levels were evaluated in SOL and TA. Treatment with DEX caused reduction in BW and in muscle weight (MW) in TA. DEX treatment also determined decrease in CSA (TA). Further, C/F and CD were also reduced (-41 and -43%, SOL) and (-30 and 68.6%, TA). Training was able to prevent C:F ratio and CD reduction (72.7 and 81.0%) and (32.9 and 54.2%) induced by DEX-treatment. Furthermore, DEX significantly reduced protein levels in SOL and TA muscles VEGFR-2 (-14.6% and -20.1%), VEGF (-15.6 and -19%), Bcl-2 (-18.4 and -20.5%), Bcl-2/Bax ratio (-29.0 and -13.7%) and p-Bax/Bax (-25.4 and -20%), beyond COX-2 in TA (-22.8%). DEX also promoted increase in caspase-3 cleaved (25 and 24.1%, SOL and TA). Moreover, training was able to prevent reduction in proteins levels in DEX-treated groups in SOL and TA: VEGFR-2 (14.7 and 25.2%), VEGF (15.3 and 25.3%), Bcl-2 (21.6 and 35.5%), Bcl-2/Bax ratio (26.1 and 19.9%), p-Bax/Bax (23.7 and 32.1%) and COX-2 (31.5%) and the increase in caspase-3 cleaved (16.0 and 17.8%). In conclusion, these results showed that DEX-induced rarefaction promoted imbalance between apoptotic and angiogenic factors, become one possible causes of hypertension. However, also showed that aerobic training is a good strategy to attenuate DEX-induced rarefaction and this response may involve a better balance between apoptotic and angiogenic factors, which contribute for the attenuation of hypertension.

Keywords: Glucocorticoids, vessel density, hypertension, aerobic training.

Sumário

1. INTRODUÇÃO/REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1.1 Aspectos fisiológicos dos glicocorticoides e os glicocorticoides sintéticos	12
1.2 Dexametasona e seus efeitos adversos.....	12
1.3 A participação dos fatores angiogênicos e apoptóticos na manutenção de vasos e capilares	13
1.4 O papel do treinamento físico aeróbio na manutenção da densidade de vasos e capilares	16
2. OBJETIVO	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Testes de capacidade máxima.....	19
3.2 Grupos experimentais	20
3.3 Protocolo de treinamento físico aeróbio	20
3.4 Determinação da pressão arterial direta.....	20
3.5 Retirada dos músculos esqueléticos e da glândula adrenal.....	21
3.6 Análises Morfométricas	22
3.7 Protocolo de dosagem de Proteínas	23
3.8 Procedimento do Western Blotting.....	24
3.9 Métodos Estatísticos	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1 Peso Corporal.....	26
4.2 Capacidade física máxima	27
4.3 Pesos musculares e da glândula adrenal	27
4.4 Análises morfométricas	28
4.4 Análises proteicas	33
4.5 Parâmetros hemodinâmicos	35
5. DISCUSSÃO.....	37
6. REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO/REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Aspectos fisiológicos dos glicocorticoides e os glicocorticoides sintéticos

Os glicocorticoides (GC) são produzidos pela zona fasciculada, os quais estão envolvidos em diversas funções fisiológicas. No ser humano o principal GC circulante é o cortisol (corticosterona em roedores) e sua síntese é regulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que é secretado pela hipófise anterior em resposta à liberação do neuropeptídeo fator liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo via sistema porta-hipofisário (Berne *et al.*, 2008). Situações como estado de febre, hipoglicemia, alteração do ciclo de sono-vigília e estresse podem influenciar a secreção de ACTH. Além disso, o próprio cortisol pode atuar sobre os receptores de GC presentes no hipotálamo e na hipófise por meio de *feedback negativo*, que inibe a liberação do CRH e ACTH (Aires, 2012). Dentre os principais efeitos fisiológicos pode-se citar a mobilização de ácidos graxos livres, de proteínas e redução da utilização celular de glicose que, conseqüentemente, disponibiliza glicose sanguínea para uso imediato (Guyton *et al.*, 2006). O cortisol também age como anti-inflamatório em tecidos lesados por traumas. Sendo assim, os glicocorticoides sintéticos, como por exemplo, a dexametasona (DEX), são amplamente utilizados em diversos casos clínicos, como no tratamento de artrite reumatoide, tratamento pós-operatório de cirurgia cardíaca, cicatrização e doenças autoimunes (Martins Junior *et al.*, 1992; Kirwan, 1995; João e Junior, 2003; Bavaresco *et al.*, 2005). Apesar de os GC sintéticos apresentarem ótimas respostas anti-inflamatórias, existem relatos de que seu uso em altas doses e por longos períodos podem trazer efeitos adversos (Saruta, 1996; Schäcke *et al.*, 2002; Severino *et al.*, 2002; De Lellis Santos *et al.*, 2007).

1.2 Dexametasona e seus efeitos adversos

A dexametasona (DEX) é amplamente prescrita em clínicas devido aos seus potentes efeitos anti-inflamatórios e antialérgicos, entretanto, pode trazer sérias complicações como aumentos de glicose sanguínea, acompanhada de dislipidemia, resistência periférica à insulina, aumento de gorduras hepáticas, redução de peso corporal e atrofia muscular (De Lellis Santos *et al.*, 2007; Pinheiro *et al.*, 2009; Barel *et al.*, 2010;

Macedo *et al.*, 2014; Krug *et al.*, 2015). Além do mais pode promover alterações hemodinâmicas, que contribui muito para o desenvolvimento de uma hipertensão arterial (HA). Neste sentido, a utilização crônica de DEX pode levar à elevação pressórica aguda, redução da eficácia de drogas anti-hipertensivas ou até mesmo agravar uma hipertensão pré-existente e este tema tem sido foco de diversos estudos a fim de compreender melhor os mecanismos envolvidos (Qiu e Baylis, 2000; Vogt e Schmid-Schönbein, 2001; Plavnik, 2002). A hipertensão induzida pela DEX pode ocorrer tanto em humanos (Pirpiris *et al.*, 1992), quanto em animais (Mondo *et al.*, 2006). No entanto, evidências experimentais mostram que o aumento da pressão arterial (PA) pode ser determinado pelo aumento do débito cardíaco (Saruta, 1996) ou aumento da resistência periférica. (Docherty *et al.*, 2001). A rarefação, ou perda de vasos e capilares, está presente em diversos tecidos de animais hipertensos (Amaral *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011; Fernandes *et al.*, 2012) e pode ser associada com aumento a resistência periférica, entretanto, poucos autores investigaram o papel da microcirculação na HA induzida pela DEX (Vogt e Schmid-Schönbein, 2001; Tran e Schmid-Schönbein, 2007).

Tem sido demonstrado que a DEX determina a perda de microvasos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Vogt e Schmid-Schönbein, 2001; Nakao *et al.*, 2012; Mirabelli *et al.*, 2014; Braun *et al.*, 2015), mas os mecanismos ainda não foram totalmente esclarecidos. Estudos sugerem que a DEX pode reduzir fatores angiogênicos, como, por exemplo, o fator de crescimento vascular (VEGF) (Barel *et al.*, 2010; Mirabelli *et al.*, 2014) o qual pode contribuir para a redução da microcirculação por meio da apoptose das células endoteliais.

1.3 A participação dos fatores angiogênicos e apoptóticos na manutenção de vasos e capilares

A manutenção da densidade de vasos e capilares é dependente de um fino balanço entre fatores angiogênicos e apoptóticos, ou seja, fatores que promovem a formação de novos vasos e fatores que promovem a morte celular. Sendo assim, a densidade de vasos é mantida por um processo complexo, com vários estágios, que envolvem remodelamento da matriz extra-celular, migração e proliferação das células endoteliais e o desbalanço deste mecanismo contribui para o aumento de morte programada das células no endotélio (Gerber *et al.*, 1998).

A angiogênese é um processo fisiológico de formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes. Dentre as diversas moléculas estimuladoras da angiogênese, o VEGF é considerado o mais potente (Nicosia *et al.*, 1994; Ho e Kuo, 2007). E seu primeiro relato foi em 1989 a partir de células bovinas (Ferrara e Henzel, 1989). Essa molécula é identificada como uma glicoproteína de 46-KD e responsável por aumentar a permeabilidade vascular, migração, proliferação e sobrevivência de células (Ferrara *et al.*, 2003). Em humanos, existem pelo menos 8 isoformas do VEGF, sendo elas: VEGF-121, VEGF-145, VEGF-148, VEGF-165, VEGF-165b, VEGF-183, VEGF-189 e VEGF-206 que interagem com receptores de tirosina quinase (RTK), que se dividem em três subtipos: VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (KDR/flk-1) e VEGFR-3 (De Fátima e De Carvalho Papa, 2010). A ação da angiogênese por meio do receptor KDR/Flk1 é considerada a mais importante, porém algumas vezes o receptor flt-1 pode desempenhar esta função (crosstalk) ou vice versa (Ferrara, 2009).

Apoptose é um mecanismo que elimina células em processos de proliferação ou diferenciação por meio de sinais internos que controlam a expressão gênica de fatores anti-apoptóticos e apoptóticos. Esta ação é promovida por membros da família das proteínas chamadas BcL-2, que tem o papel de induzir ou suprimir a morte celular das células endoteliais (Jung *et al.*, 2014). Das que induzem apoptose são: Domínio de homologia ao BcL-2 (Bid), antagonista/assassino homólogo (Bak), promotor de morte associada à BcL-2 (Bad), assassino 1 antagonista de BcL-2 (Bax), entre outras. Por outro lado, existem as anti-apoptóticas, que são: Proteína 2 de linfoma de célula B (BcL-2), proteína x associada ao BcL-2 (BcL-x₂) e Linfoma 2 de célula B de leucemia linfóide crônica BcL-XL (Borner, 2003). Este processo pode ser ativado por estresse intra ou extracelular, danos no DNA, hipóxia ou deprivação de fatores de crescimento (Grivicich *et al.*, 2007). Com a ocorrência de um destes fatores, as proteínas apoptóticas competem com os sítios de ativação das proteínas anti-apoptóticas, o que resulta em morte celular.

A ação do VEGF pode ocorrer basicamente de duas formas a partir da ativação de seus receptores. Como pode ser visto na Figura 1, ocorre uma ação, via segundo mensageiro, que garante a permeabilidade vascular, proliferação celular ou via fosfoinositol 3-quinase (PI3k)/proteína quinase B (AKT), o que garante a sobrevivência celular. A primeira ação ocorre a partir da ativação da enzima fosfolipase C (PLC) que, por sua vez, estimula a formação do diacilglicerol (DAG) e IP₃-inositol 1,4,5-trifosfato, o que aumentam Ca²⁺ intracelular e, conseqüentemente, a produção do NO, ao partir da

ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Já, o outro mecanismo ocorre pela ativação da via PI3k/AKT. A AKT fosforila a proteína Bax, que se encontra próxima à mitocôndria, desativando-a e garantindo a sobrevivência da célula (Gerber *et al.*, 1998; Roy *et al.*, 2006).

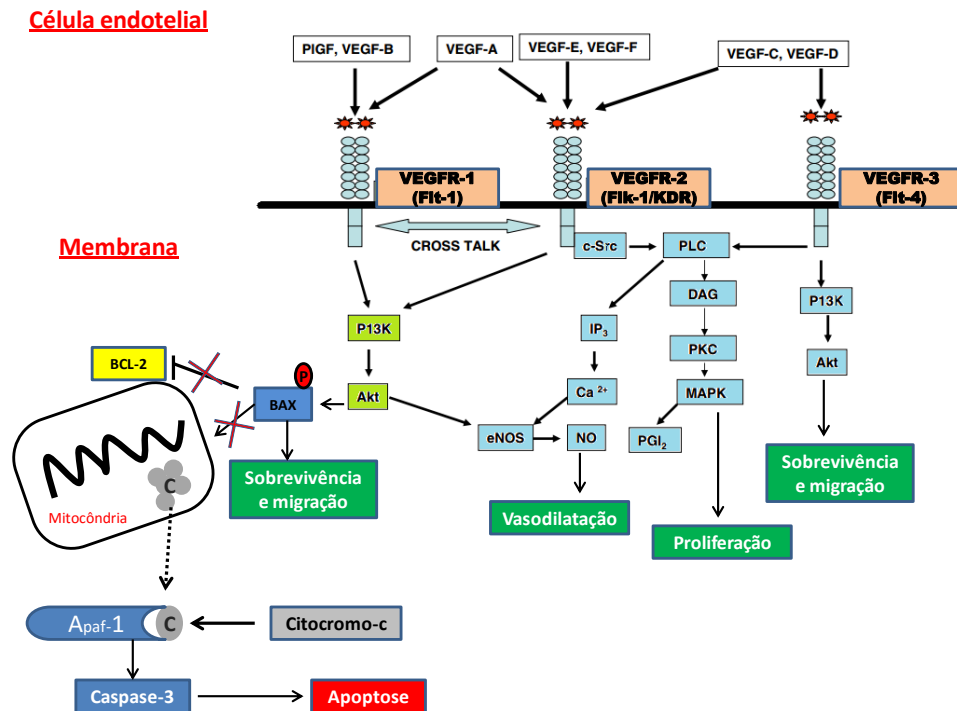


Figura 1. Demonstração esquemática das vias de ativação angiogênica e apoptótica. Adaptado de (Roy *et al.*, 2006; Grivicich *et al.*, 2007; Sanz *et al.*, 2008).

Na ausência dos fatores angiogênicos, a fosforilação da proteína apoptótica (Bax) não acontece, possibilitando assim a Bax competir com os sítios de ligação das proteínas anti-apoptóticas na mitocôndria o que permite que ocorra a liberação do citocromo C de dentro da mitocôndria para o citoplasma. O citocromo C, fora da mitocôndria, cliva o apoptossomo (apaf-1) dando início ao processo de formação das caspases, que ativa a procaspase-9 e logo em seguida a caspase-3, que irá sinalizar clivar e condensar as células para posteriormente serem fagocitadas por macrófagos (Grivicich *et al.*, 2007), o que resulta em rarefação.

Tem sido demonstrado que a DEX determina redução do número de vasos, tanto *in vitro* como *in vivo*, no entanto, os mecanismos responsáveis por esta resposta ainda não são totalmente conhecidos (Vogt e Schmid-Schönbein, 2001; Nakao *et al.*, 2012;

Mirabelli *et al.*, 2014; Braun *et al.*, 2015). Alguns trabalhos mostram que uma das possíveis causas desta alteração se dá por conta da DEX reduzir a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2), que está envolvida na produção de VEGF (Koedam *et al.*, 2002; Iwai *et al.*, 2004; Hori *et al.*, 2010). Portanto, é possível que esteja ocorrendo uma redução de fatores angiogênicos (Barel *et al.*, 2010; Mirabelli *et al.*, 2014), um aumento de fatores apoptóticos (Braun *et al.*, 2015) ou até mesmo a combinação dos dois efeitos, na determinação da rarefação causada pelo uso crônico de DEX.

1.4 O papel do treinamento físico aeróbio na manutenção da densidade de vasos e capilares

O treinamento físico aeróbio tem sido considerado um tratamento não farmacológico da HA (Melo *et al.*, 2003; Amaral *et al.*, 2008; Coimbra *et al.*, 2008; Mancia *et al.*, 2013). Seu efeito de prevenção contra a rarefação e/ou estímulo da angiogênese tem sido demonstrado em animais normotensos e hipertensos (Amaral *et al.*, 2000; Amaral *et al.*, 2001; Melo *et al.*, 2003; Coimbra *et al.*, 2008; Amaral e Michelini, 2011; Fernandes *et al.*, 2012; Hoier e Hellsten, 2014). A angiogênese induzida pelo treinamento físico aeróbio pode estar associada com o aumento dos níveis proteicos de VEGF e Bcl-2, bem como com a redução dos níveis de caspase-3 clivada na retina de ratos diabéticos (Amaral *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2013) a qual contribui para a manutenção da densidade de vasos e capilares. Além disso, outros estudos demonstraram que o VEGF pode ser estimulado com exercício aeróbio agudo (Pryor *et al.*, 2010) e que com poucos dias é possível observar aumento na densidade de vasos (Amaral *et al.*, 2008). Entretanto, é sabido também que uma densidade de vasos reduzida em diversos tecidos pode acarretar em sérios problemas consequentes de uma oxigenação inadequada. Apesar de diversos trabalhos relatarem que a DEX promove a rarefação devido a sua utilização crônica, os mecanismos envolvidos não foram investigados. Demonstramos recentemente que o tratamento com altas doses de DEX promove redução de VEGF na musculatura esquelética e cardíaca de ratos, a qual não foi atenuada pelo pré-condicionamento físico em esteira (Barel *et al.*, 2010), mas os mecanismos envolvidos nesta resposta não foram avaliados. Além disso, é possível que doses menores de DEX possam determinar resultados mais amenos e assim serem atenuados pelo treinamento físico. Portanto, apesar dos achados até o presente momento sugerirem que

o treinamento físico pode alterar os fatores angiogênicos e apoptóticos, pouco se sabe sobre os efeitos do exercício físico na redução de vasos induzida por DEX.

Os resultados expostos até o momento apresentam evidências de que o exercício aeróbio pode acarretar em resultados positivos no balanço entre fatores angiogênicos e apoptóticos. A hipótese deste trabalho foi que um pré-condicionamento físico possa atenuar um possível desbalanço entre estes fatores após um tratamento crônico com baixas doses de DEX.

2. OBJETIVO

Geral: Investigar os mecanismos causados pelo tratamento crônico com DEX como, redução de peso corporal e massa muscular, diminuição da área de secção transversa de fibras musculares. E como foco principal, investigar se a DEX compromete a densidade de vasos por alterar o balanço angiogênico/apoptótico na musculatura esquelética e se esta alteração contribui para o aumento da PA se o pré-condicionamento físico aeróbio atenua estas respostas.

Específicos:

1. Determinar os efeitos do tratamento crônico com DEX nos mecanismos responsáveis pelo controle da densidade de vasos. Para tanto, foi determinada a produção proteica de VEGFR-2, VEGF, COX-2, Bcl-2, Bax, caspase-3 clivada, na musculatura esquelética, bem como a densidade de vasos, razão capilar/fibra nos animais sedentários, tratados ou não com DEX.

2. Verificar se o pré-condicionamento físico aeróbio altera os mecanismos responsáveis pelo controle da densidade de vasos nos animais tratados ou não com DEX. Para tanto, foi determinada a produção proteica de, VEGFR-2, VEGF, COX-2, Bcl-2, Bax, caspase-3 clivada, na musculatura esquelética, bem como a densidade de vasos, razão capilar/fibra nos animais treinados, tratados ou não com DEX.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 60 ratos machos (Wistar) de 8 semanas de idade (200-250g), provenientes do Centro de Pesquisa e Produção da UNESP (Botucatu, SP, Brasil). Durante todo o protocolo, os animais eram mantidos em gaiolas com até quatro animais, com ciclo claro escuro de 12:00 horas e temperatura controlada (22°C). Ração e água foram fornecidas *at libitum*. Os ratos foram pesados semanalmente do início ao fim dos estudos (balança Filizola). Todos os métodos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade Estadual Paulista, UNESP (protocolo #1436/2014). A fim de projetar um protocolo experimental preventivo, DEX ou solução salina foram administrados durante 14 dias após as 8 semanas de um programa de exercícios. Metade do grupo recebeu tratamento com DEX (50 µg/ kg de peso corporal por dia, *s.c.*) e a outra metade (animais controles) solução salina, no mesmo volume que a DEX e durante os mesmos 14 dias.

3.1 Testes de capacidade máxima

A capacidade máxima foi avaliada de forma indireta por meio de teste de esforço máximo em esteira ergométrica. Após um período inicial de adaptação à esteira (5-10 dias), os ratos eram selecionados segundo sua habilidade em andar/correr na esteira ergométrica adaptada para ratos (10 raias suspensas de ferro). Todos os animais realizaram um teste de esforço máximo (TEM), utilizando um protocolo escalonado previamente publicado (Silva *et al.*, 1997), com incrementos de 3 m/min a cada 3 min. Sendo assim, a capacidade máxima foi determinada quando o animal não conseguia mais correr espontaneamente. O teste de esforço máximo foi realizado no início (TEM-1), após 4 semanas (TEM-2, para reajuste das intensidades) e ao final, após 8 semanas (TEM-3). Os animais sedentários realizaram os testes nos mesmos momentos que os treinados e foram adaptados à esteira pelo menos a cada 15 dias.

3.2 Grupos experimentais

Após a avaliação da capacidade física máxima, os ratos foram alocados em quatro grupos experimentais sendo que todos os grupos apresentavam capacidade física e peso corporal semelhantes.

Grupo 1 - Sedentário Controle: composto por animais que permaneceram sedentários durante todo o protocolo experimental e foram tratados com solução salina nos últimos 14 dias (salina, *s.c.*).

Grupo 2 - Sedentário Tratado: composto por animais que permaneceram sedentários durante todo o protocolo experimental e foram tratados com DEX nos últimos 14 dias (decadron[®], 50µg/kg de peso corporal por dia, *s.c.*).

Grupo 3 – Treinado Controle: composto por animais que realizaram o treinamento aeróbio durante todo o protocolo experimental e foram tratados com solução salina nos últimos 14 dias (salina, *s.c.*).

Grupo 4 – Treinado Tratado: composto pelos animais que realizaram o treinamento aeróbio durante todo o protocolo experimental e foram tratados com DEX nos últimos 14 dias (decadron[®], 50µg/kg de peso corporal por dia, *s.c.*).

3.3 Protocolo de treinamento físico aeróbio

O treinamento físico foi realizado em esteira ergométrica durante uma hora por dia, 5 dias na semana, por 60 dias, com intensidade de 50-60% da velocidade máxima atingida no teste de esforço inicial (TEM-1).

3.4 Determinação da pressão arterial direta

3.4.1 Confeções das cânulas

Para a confecção das cânulas foram utilizados tubos de polietileno PE-50 (Scientific Commodities Inc.), aos quais eram previamente soldados a tubos de polietileno PE-10 (Scientific Commodities Inc), conforme previamente publicado (Amaral *et al.*, 2001).

Após o período de tratamento os animais foram então anestesiados com Tribromo Etanol (2,5g/100ml, na dose de 1ml para cada 100g do peso corporal) e posteriormente foi realizada incisão no pescoço do animal. Após a localização da artéria carótida, foi introduzida a parte mais fina da cânula preenchida com solução fisiológica heparinizada no local, já a outra parte da cânula foi exteriorizada na região dorsal do animal. Logo após o término do procedimento foi aplicado um analgésico não esteroidal BANAMINE (flunixin meglumina, 0,3ml) de forma subcutânea e esperado um período de recuperação de 24 horas.

3.4.2 Registro de pressão arterial e frequência cardíaca

Após a recuperação da cirurgia por 24 h, já com os animais acordados, a PA foi registrada através da conexão da cânula da artéria carótida ao sistema de registro (transdutor + pré-amplificador, ADInstrument[®]), o qual foi conectado ao computador. PA pulsátil e a frequência cardíaca (FC) foram registrados utilizando o software LabChartProv.7.

3.5 Retirada dos músculos esqueléticos e da glândula adrenal

Após o registro de PA e FC, os animais foram eutanasiados por excesso de anestésico DOPALEN[®] (cloridrato de quetamina, 160mg/kg) e ANASEDAN[®] (cloridrato de xilasina, 20mg/kg), VETBRANDS do Brasil e os músculos esqueléticos sóleo (SOL), tibial anterior (TA), miocárdio e glândula adrenal foram cuidadosamente removidos, limpos em solução salina e pesados. Ao final, foi retirada a tíbia dos animais para a normalização dos pesos dos tecidos. Logo após a pesagem, os músculos foram separados da seguinte forma: membros traseiros esquerdos para análises de proteína e armazenado no freezer -80. Os membros traseiros direitos foram armazenados para análises

histológicas, os quais foram envolvidos por talco neutro, cobertos com *tissue tech* e mergulhados em nitrogênio líquido e logo após foram acondicionados no freezer a -80°C até o momento das análises.

Uma linha do tempo foi feita para ilustrar o protocolo experimental de 76 dias e pode ser observado na Figura 2:

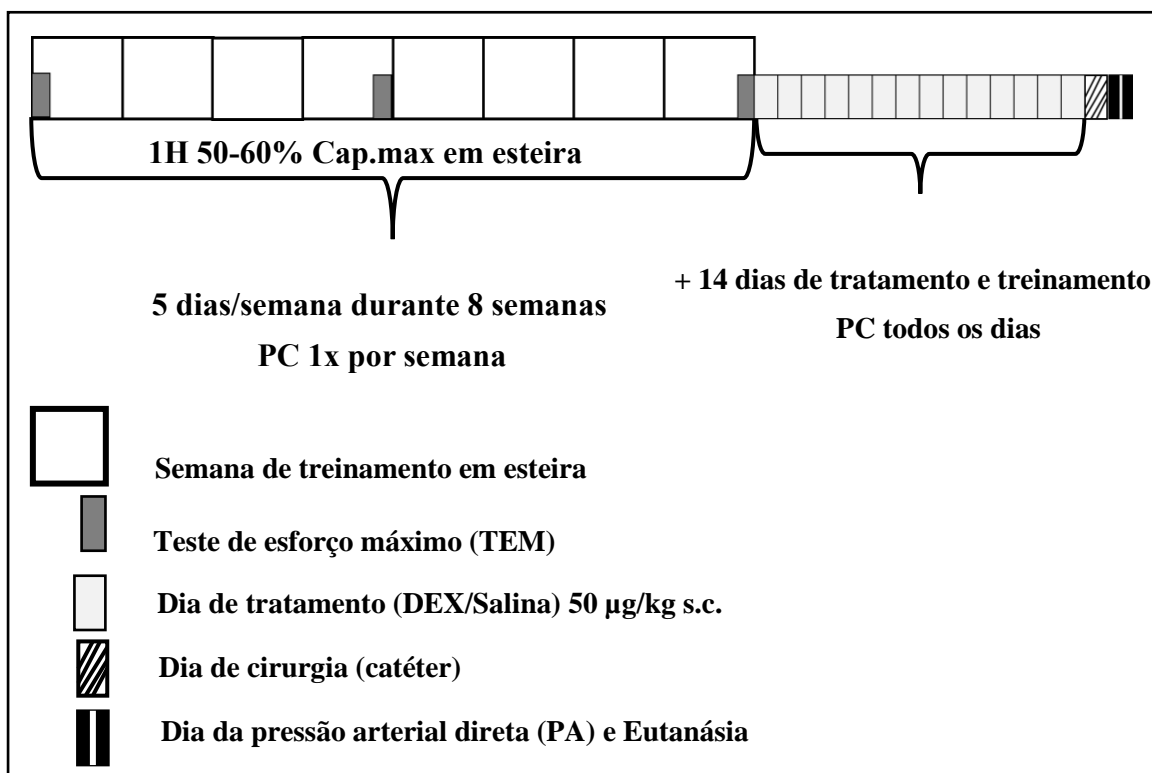


Figura 2. Linha do tempo experimental. Teste de esforço máximo (TEM), peso corporal (PC).

3.6 Análises Morfométricas

Todo o material coletado congelado foi colocado no criostato (-20°C) (Leica®, CM 1850, Nussloch, Alemanha) para realização de cortes transversais de 5-10 µm e, em seguida, as secções 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. Foi determinada a densidade capilar (número de vasos por mm²), a razão capilar por fibra (C/F) e a área de secção transversa (AST) das fibras musculares nos músculos SOL e TA (Moura *et al.*, 2011).

Todo o material coletado (músculos esqueléticos) foi submetido a processos de rotina de microscopia óptica: as amostras congeladas passaram por processo de desidratação com etanol e emblocagem. Para cada animal, foram feitas 4 lâminas e, cada lâmina possuía 6 cortes transversais. Estes cortes foram observados em microscópio de luz (microscópio Olympus BX50), com lentes objetivas de 20x ou 40x. Todas as imagens foram digitalizadas e armazenadas utilizando um programa de computador (DP Controller, Olympus micro DP70). As análises morfométricas foram realizadas pelo computador, utilizando-se um programa específico de análise de imagem (IMAGE-PRO Plus), previamente publicado (Amaral *et al.*, 2000; Melo *et al.*, 2003). Para a análise do número de capilares, utilizou-se o contraste de imagens e o cursor, os quais permitiram a contagem de capilares da microcirculação. Nas mesmas imagens foi também determinado o número de fibras musculares, visando a obtenção da razão de capilares/fibra (Amaral *et al.*, 2000; Amaral *et al.*, 2001).

3.7 Protocolo de dosagem de Proteínas

Os músculos SOL e TA do membro posterior esquerdo dos ratos foram homogeneizados em solução RIPA (Cell Signaling Technology, MA, EUA) contendo: 0,5 mM Tris-hidroclorito de sódio HCl, pH 7,4, 1,5 mM cloreto de sódio (NaCl), 2,5% ácido deoxicólico, 10% NP-40, 10 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e imediatamente antes do uso foi adicionado um coquetel de inibidores de proteases (Pic) (0,1%, Sigma Aldrich, MO, EUA) e 1% de Fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF, Sigma-Aldrich, MO, EUA).

Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4^oC com 10.000 rpm, em seguida o sobrenadante foi coletado e então transferido para um novo tubo, eppendorf, os quais foram armazenados em freezer -20^oC para as análises de produção das proteínas. As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Bradford, utilizando um kit comercial (Bio-Rad Kit, Protein Assay Standart II, Hercules, CA) como previamente publicado (Amaral *et al.*, 2001). Os valores de absorvância foram analisados no leitor de microplacas (BMG Labtech, Spectro Star nano, HE, ALE) utilizando uma placa de 96 poços. Após a dosagem, as amostras foram estocadas a -20^oC e utilizadas para os experimentos de Western Blotting.

3.8 Procedimento do Western Blotting

A proteína foi eletroforéticamente separada por tamanho, usando-se um sistema de gel de poli-acrilamida, conforme publicação prévia do laboratório (Macedo *et al.*, 2014). Basicamente, foi utilizado um gel com duas camadas de poli-acrilamida, em diferentes concentrações: 5% na camada superior e 10% na camada inferior. As amostras (50 µg) foram colocadas para correr em solução tampão de corrida (190mM glicina, 25mM Tris, 0.1% SDS pH 8.3), por 60 minutos a 200 V. Marcadores de peso molecular foram simultaneamente utilizados como tamanho padrão. As proteínas foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose com aplicação de corrente de 120V por 2 horas em solução tampão de transferência (190 mM glicina, 25 mM Tris, 20% metanol, pH 8.3). Logo após a transferência, a equivalência da quantidade de proteína colocada em cada coluna foi conferida com a colocação em *Ponceau*. As membranas foram lavadas em tris tampão salina (TBS-T, 50 mM Tris e 750 mM NaCl; pH 5.8, com 1% de Tween-20). As membranas foram incubadas com solução bloqueadora (albumina bovina, BSA, 3% em TBS-T) por 2 minutos. O SNAP i.d.[®] 2.0, Sistema de detecção de proteínas (Merck-Millipore, MA, EUA) foi utilizado para incubar as membranas por 10 minutos com anticorpo primário: Receptor-2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-2, anti-coelho monoclonal, 1:1.000 in 3% BSA, Cell Signaling Tech, MA, EUA), (VEGF anti-camundongo monoclonal, 1:1.000 in 3% BSA, BD Pharmingen, CA, EUA), ciclooxigenase-2 (COX-2, anti-coelho monoclonal, 1:500 in 3% BSA, Thermo Scientific, CA, EUA), (BcL-2, anti-coelho policlonal, 1:500 in 5% BSA, Cell Signaling Tech, MA, EUA), (Bax, anti-coelho policlonal, 1:500 in 3% BSA, Cell Signaling Tech, MA, EUA), (p-Bax, anti-coelho policlonal, 1:1.000, Byorbyt, Cambridge, UK), (caspase-3 clivada, anti-coelho policlonal, 1:1.000, Cell Signaling Tech, MA, EUA) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (anti-GAPDH, 1:1.000 in 3% BSA, R&D Systems, MN, EUA). Em seguida as membranas foram lavadas com TBS-T, incubadas por dez minutos com os respectivos anticorpos secundários (anti-camundo ou anti-coelho, conforme a origem dos anticorpos primários). O anticorpo foi detectado por luminescência química aumentada (Super Signal Pico, Pierce, IL, USA) e as membranas foram expostas a um filme de radiografia (Fujifilm[®]), as bandas foram analisadas utilizando um programa de computador (Scion Image, Corporation, Beta 4.02).

3.9 Métodos Estatísticos

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. Para todos os experimentos foi utilizada (ANOVA) de dois caminhos. Sendo 1 caminho o treinamento e outro caminho o tratamento. Nas análises de valores de peso, e capacidade máxima foi utilizado o test-*Tstudent*. O post-hoc de Tukey foi utilizado nas amostras que apresentaram diferenças significativas. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Peso Corporal

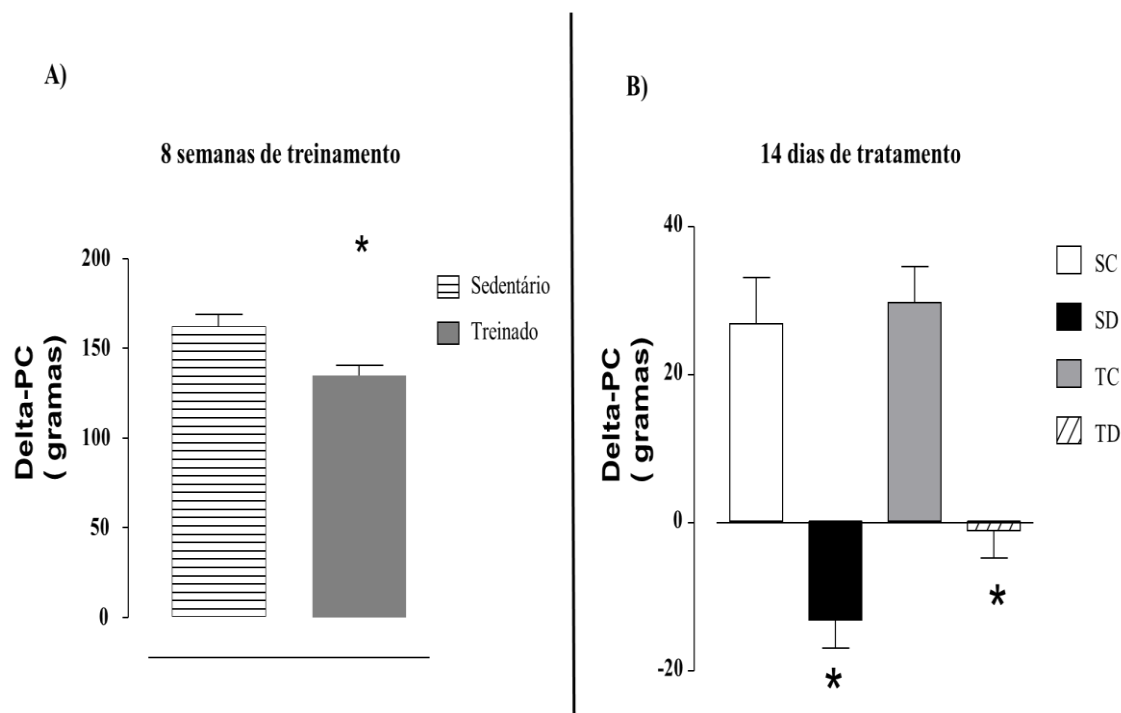


Figura 3. Peso corporal (PC) após as 8 semanas de treinamento físico (A) para sedentários (n = 26) e treinados (n = 34) e após 14 dias de tratamento com DEX (B) em todos os grupos analisados. Controle sedentário (SC, n = 13), sedentário tratado com DEX (SD, n = 13), treinado controle (TC, n = 19) e treinado e tratado com DEX (TD, n = 15). Significância: * controle vs, + vs sedentários, $p < 0,05$

O peso corporal (PC) dos animais foi avaliado durante todo o período do protocolo experimental de 76 dias e estão ilustrados na Figura 3. No início do protocolo, todos os ratos apresentavam o PC similar ($265,0 \pm 21,1$; $252,6 \pm 30,1$; $255,6 \pm 22,1$; $256,3 \pm 11,9$ g, para SC, SD, TC, TD, respectivamente). Durante as 8 semanas de treinamento, todos os grupos aumentaram de peso, porém, no término deste período, o PC dos animais treinados foi menor quando comparado aos sedentários (-17,0% Treinado vs Sedentário), como pode ser observado na Figura 3A. Após o período de 14 dias de tratamento com DEX (Figura 3B), os ratos dos grupos SD e TD apresentaram valores de PC significativamente menores que seus respectivos controles (-7,0% e -5,8%, respectivamente, $p < 0,05$).

4.2 Capacidade física máxima

Foram realizados três testes de capacidades física máxima com todos os animais ao longo das 8 semanas do protocolo de treino (antes, durante e no término). Pode-se observar na Figura 4 que os animais treinados apresentaram capacidade física maior que os sedentários.

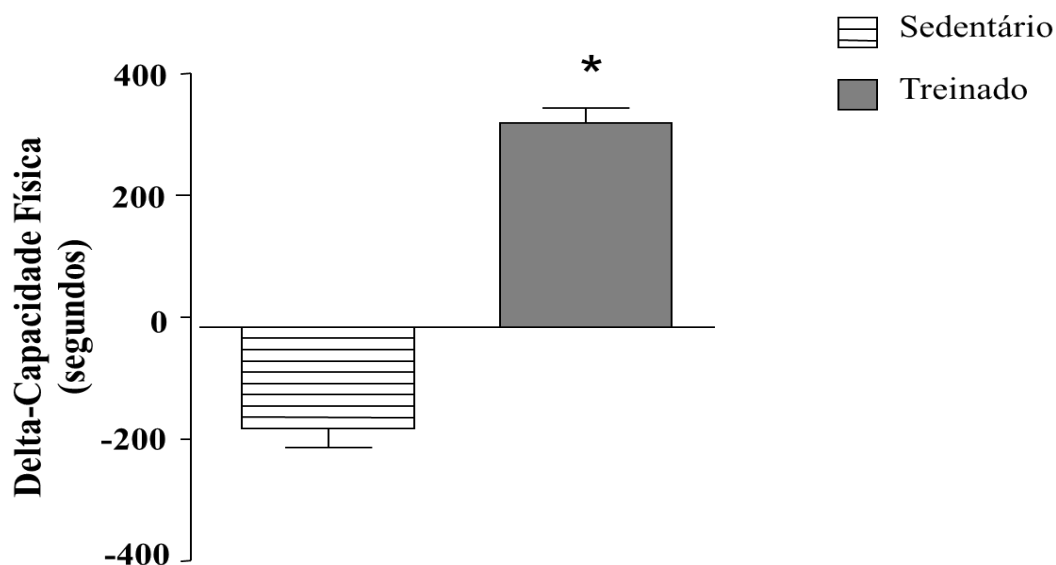


Figura 4. Capacidade física máxima expressa pelo tempo de corrida (s) na esteira para sedentários (n = 26) e treinados (n = 34). Significância: + vs sedentários, $p < 0,05$.

4.3 Pesos musculares e da glândula adrenal

Pode-se observar na Tabela 1 que o músculo TA teve uma redução de -8,3% em seu peso determinado pelo tratamento com DEX e que o TF não atenuou esta redução, uma vez que os animais do grupo TD apresentaram um TA -6,6% menor que os animais TC. O coração e os músculos SOL e miocárdio não apresentaram alterações de massa após tratamento com DEX. Entretanto, a glândula adrenal estava significativamente menor nos dois grupos tratados com DEX em comparação com os controles.

Tabela 1. Valores de massa muscular e glândula adrenal normalizados pela tíbia nos diferentes grupos analisados.

	SC	SD	TC	TD
Tíbia (cm)	4,20±0,05	4,08±0,02	4,12±0,03	4,08±0,03
Coração (mg/cm)	275,11±5,34	263,55±6,40	257,83±7,88	255,72±5,06
Miocárdio (mg/cm)	193,40±6,40	182,80±4,62	181,18±6,39	178,03±3,61
SOL (mg/cm)	39,07±2,09	36,20±2,01	38,32±1,89	36,72±1,73
TA (mg/cm)	176,42±5,02	161,83±3,05 *	173,86±3,19	162,99±2,99 *
G.A (mg/cm)	16,71±1,04	10,39±0,51 *	16,05±1,45	10,39±0,69 *

4.4 Análises morfométricas

As Figuras 5 e 6 ilustram as secções transversas dos músculos SOL e TA. A Figura 5 mostra que o músculo SOL não apresenta redução de AST das fibras, enquanto que no TA (Figura 6) esta redução parece ser mais evidente.

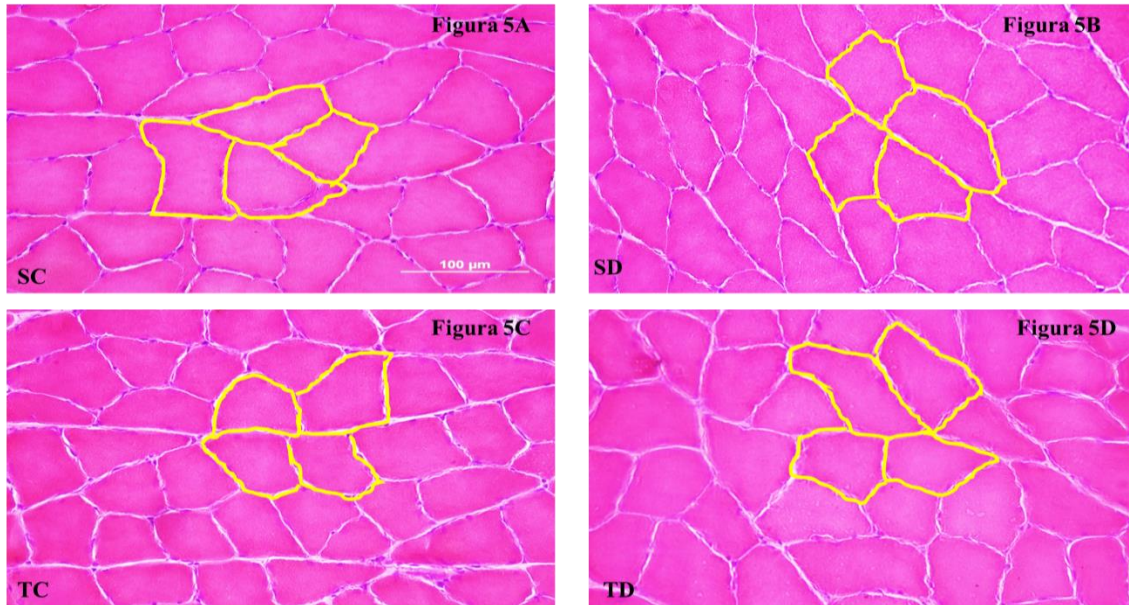


Figura 5. Secções transversas do músculo SOL, coradas com hematoxilina-eosina, representativas de um rato de cada grupo, sedentário controle (SC), sedentário tratado com DEX (SD), treinado controle (TC) e treinado e tratado com DEX (TD). Círculos amarelos indicam a área da fibra muscular. Aumento de 20X, a barra representa 100µm.

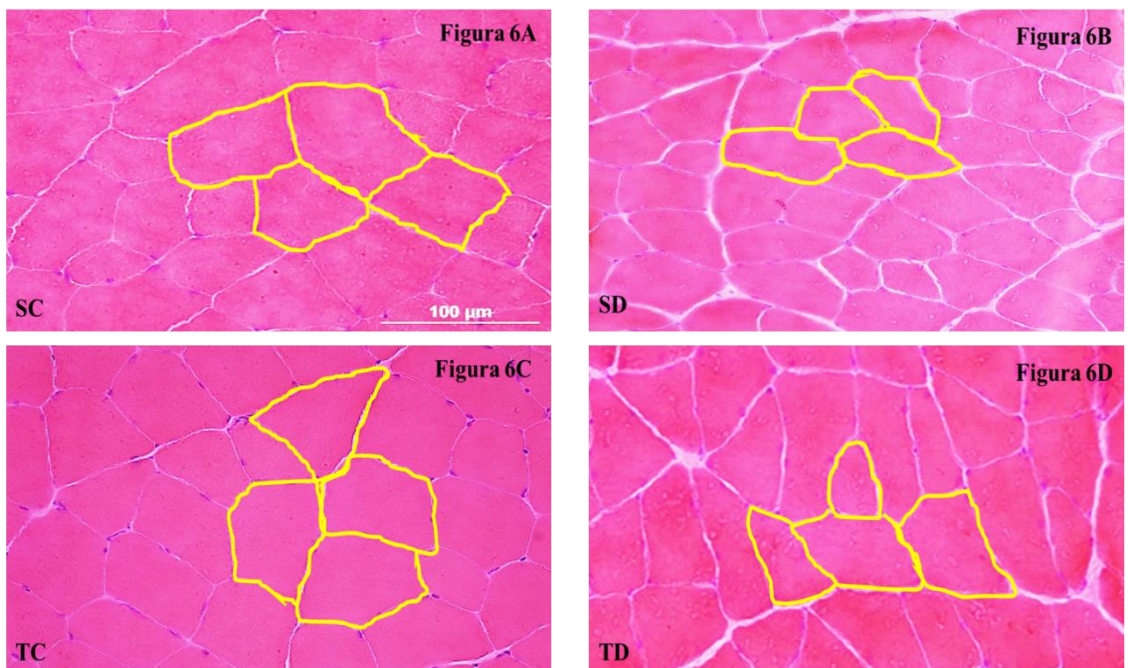


Figura 6. Secções transversas do músculo TA, coradas com hematoxilina-eosina, representativas de um rato de cada grupo, sedentário controle (SC), sedentário tratado com DEX (SD), treinado controle (TC) e treinado e tratado com DEX (TD). Círculos amarelos indicam a área da fibra muscular. Aumento de 20X, a barra representa 100µm.

As análises densitométricas demonstram que a AST das fibras no SOL não foi afetada nem pela DEX nem pelo TF (Figura 7A), no entanto, houve redução significativa de -18,30% da AST das fibras no TA, determinada pelo tratamento crônico com DEX (Figura 7B). Os animais do grupo TD também apresentaram redução de AST das fibras do TA quando comparados aos controles TC (-16,52%).

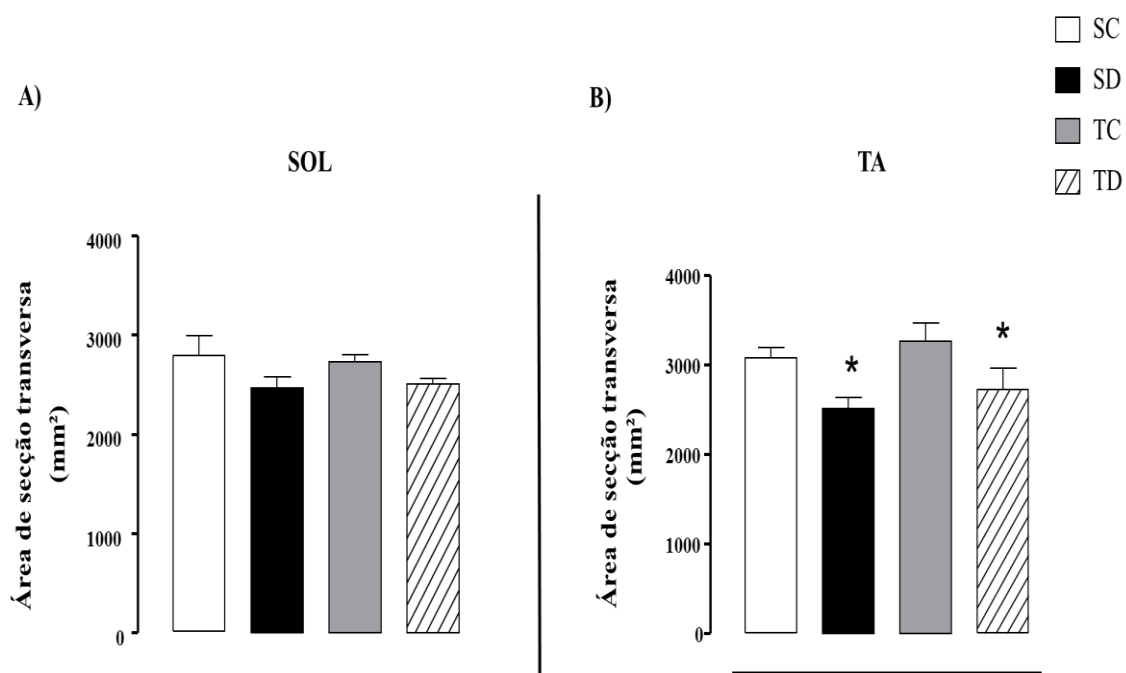


Figura 7. Análise densitométrica da área seção transversa das fibras do músculo SOL (7A) e TA (7B) em todos os grupos analisados: controle sedentário (SC, n = 7), sedentário tratado com DEX (SD, n = 9), treinado controle (TC, n = 9) e treinado e tratado com DEX (TD, n = 8). Significância: * vs controle e + vs sedentário, $p < 0,05$.

As Figuras 8 e 9 estão demonstrando os capilares (setas amarelas). Pode ser observado que houve uma redução na densidade vascular induzida pela DEX e que esta redução é atenuada pelo TF em ambos os músculos SOL (Figura 9) e TA (Figura 10)

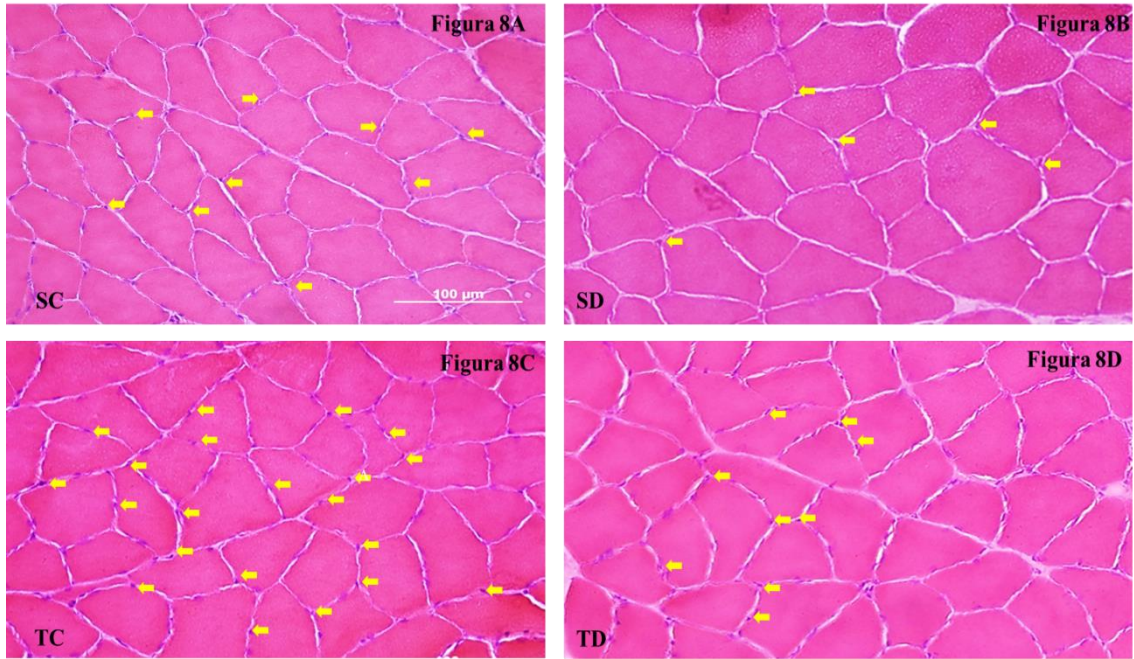


Figura 8. Secções transversas do músculo SOL, corado com hematoxilina-eosina, foto tirada de um rato de cada grupo, sedentário controle (SC), sedentário tratado com DEX (SD), treinado controle (TC) e treinado e tratado com DEX (TD). Setas amarelas indicam o capilar. Aumento de 20X, a barra representa 100µm.

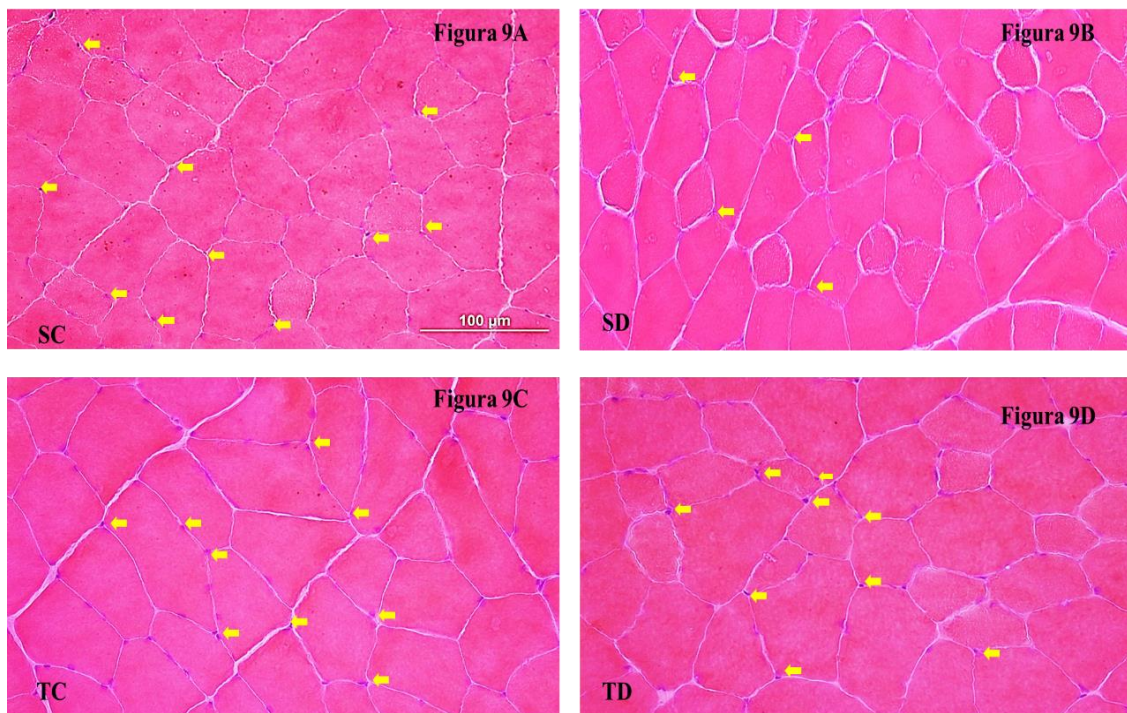


Figura 9. Secções transversas do músculo TA, corado com hematoxilina-eosina, foto tirada de um rato de cada grupo, sedentário controle (SC), sedentário tratado com DEX (SD), treinado controle (TC) e treinado e tratado com DEX (TD). Setas amarelas indicam o capilar. Aumento de 20X, a barra representa 100µm.

As análises morfométricas quantitativas estão ilustradas nas Figuras 10 (SOL) e Figura 11 (TA). Pode ser observado na Figura 10 que o tratamento crônico com DEX reduziu significativamente a razão C/F e DC no grupo SD (-41 e -43% vs SC respectivamente, $p < 0,05$). No entanto, o treinamento foi capaz de aumentar significativamente a razão C/F e DC no músculo SOL (+43,2 e +45,0% TC vs SC respectivamente, $p < 0,05$).

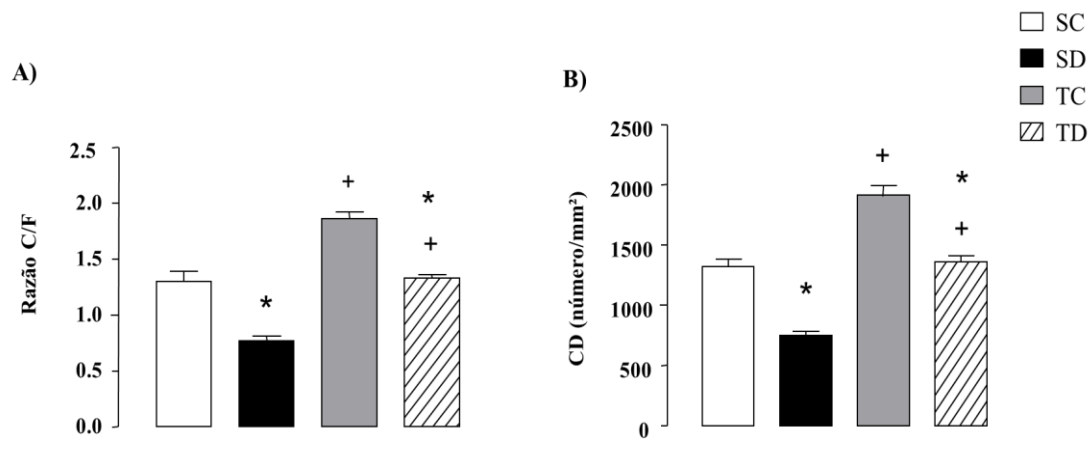


Figura 10. Razão capilar/fibra (C/F) para (A) e a densidade capilar (DC) (B) no músculo SOL em todos os grupos analisados: controle sedentário (SC, n = 7), sedentário tratado com DEX (SD, n = 9), treinado controle (TC, n = 9) e treinado e tratado com DEX (TD, n = 8). Significância: * vs controle e + vs sedentários, $p < 0,05$.

No músculo TA (Figura 11), o tratamento com DEX também determinou a redução da razão C/F e DC no grupo SD (-30,0 e 68,6%, vs SC), $p < 0,05$. Por outro lado, o treinamento proporcionou um aumento de 10,3% na razão C/F, comparado ao grupo SC, $p < 0,05$. O mesmo não ocorreu com a DC, o qual não se mostrou diferente quando comparado ao grupo TC. No entanto, o treinamento foi eficaz em prevenir a redução da razão C/F e DC, tanto no SOL (72,7 e 81,0%, TD vs SD), quanto no TA (32,9 e 54,2%, TD vs SD), $p < 0,05$).

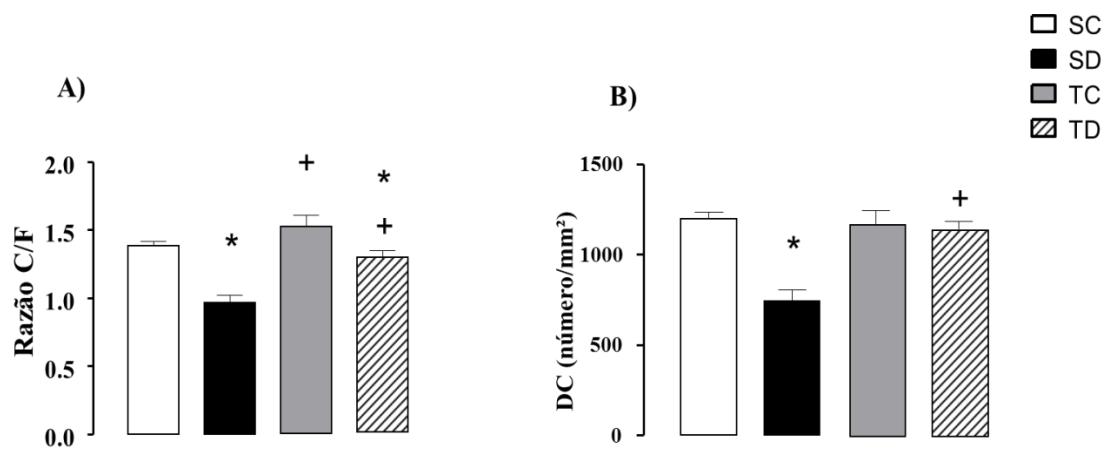


Figura 11. Razão capilar/fibra (C/F) para (A) e a densidade capilar (DC) (B) no músculo TA em todos os grupos analisados: controle sedentário (SC) (n = 7), sedentário tratado com DEX (SD) (n = 9), treinado controle (TC) (n = 9) e treinado e tratado com DEX (TD) (n = 8). Significância: * controle vs e + vs sedentários, $p < 0,05$.

4.4 Análises proteicas

As figuras 12 e 13 ilustram os resultados de produção proteica nos músculos SOL e TA, respectivamente. Pode ser observado na Figura 12 que o tratamento crônico com DEX diminuiu significativamente a produção proteica do VEGFR-2 (-14,6%, Figura 12A), VEGF (-15,6%, Figura 12B), Bcl-2 (-18,4%, Figura 12C), razão Bcl-2/Bax (-29,0%, Figura 12E) e p-Bax/Bax (-25,4%, Figura 12F) quando comparados com SC ($p < 0,05$). Por outro lado, os níveis proteicos da caspase-3 clivada (Figura 12G) estavam significativamente aumentados no grupo SD (25,0% vs SC, $p < 0,05$). Entretanto, o treinamento foi eficaz em aumentar significativamente a produção de VEGFR-2 (14,7%), VEGF (15,3%), Bcl-2 (21,6%) razão Bcl-2/Bax (26,1%) e p-Bax/ Bax (23,7%) em relação aos sedentários SD ($p < 0,05$). Além disso, o TF preveniu o aumento da caspase-3 clivada no SOL (16,0%, para TD vs SD, $p < 0,05$).

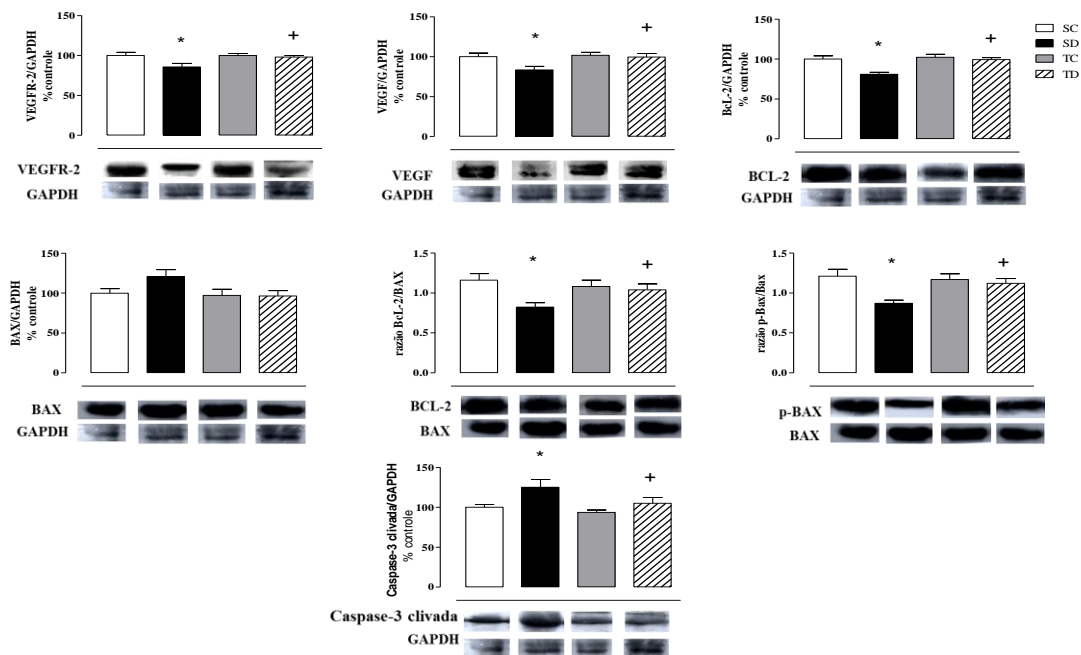


Figura 12. Análises quantitativas e géis representativos da produção proteica utilizando a técnica de Western blotting: Receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-2, A), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, B), proteína 2 de linfoma de célula B (Bcl-2, C), assassino 1 antagonista de BCL-2 (Bax, D), razão Bcl-2/Bax (E), razão p-Bax/Bax (F) e caspase-3 clivada (G). Concentração de 50 μ g de proteína do músculo SOL (8-10 ratos). Sedentário controle (SC), sedentário tratado com DEX (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com DEX (TD). Valores são expressos como % do controle. Significância: * vs controle e + vs sedentário, $p < 0,05$.

Da mesma forma que foi observado no músculo SOL, o tratamento crônico com DEX no TA diminuiu significativamente a produção proteica do VEGFR-2 (-20,1%, Figura 13A), VEGF (-19,0%, Figura 13B), COX-2 (22,8%, Figura 13C), Bcl-2 (-20,5%, Figura 13D), razão Bcl-2/Bax (-13,7%, Figura 13F), p-Bax/Bax (-20,0%, Figura 13G) quando comparados com SC ($p < 0,05$). Por outro lado, os níveis proteicos da caspase-3 clivada (Figura 13H) estavam significativamente aumentados no grupo SD (24,1% vs SC, $p < 0,05$). Entretanto, treinamento foi eficaz em aumentar significativamente a produção de VEGFR-2 (25,2%), VEGF (25,3%), Bcl-2 (35,5%), razão Bcl-2/Bax (19,9%), p-Bax/Bax (32,1%) e COX-2 (31,5%), comparando TD vs SD ($p < 0,05$). Além do mais, o TF conseguiu prevenir o aumento da caspase-3 clivada (17,8%, para TD vs SD ($p < 0,05$)).

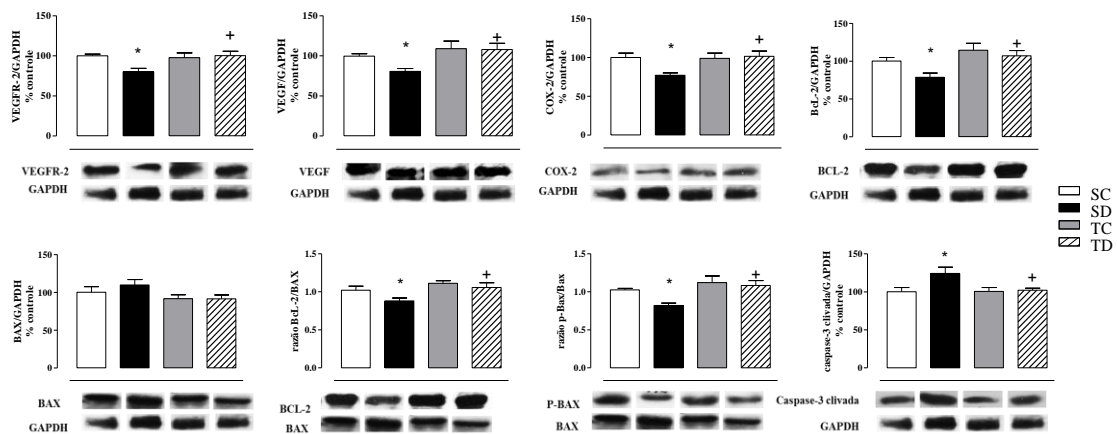


Figura 13. Análises quantitativas e géis representativos da produção proteica utilizando a técnica de Western blotting: Receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-2, A), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, B), cicloxigenase-2 (COX-2, C), proteína 2 de linfoma de célula B (Bcl-2, D), assassino 1 antagonista de BCL-2 (Bax, E), razão Bcl-2/Bax (F), razão p-Bax/Bax (G) e caspase-3 clivada (H). Concentração de 50µg de proteína do músculo TA (n=8-10). Sedentário controle (SC), sedentário tratado com DEX (SD), treinado controle (TC) e treinado tratado com DEX (TD). Valores são expressos como % do controle. Significância: * vs controle e + vs sedentário, $p < 0,05$.

4.5 Parâmetros hemodinâmicos

A Tabela 2 demonstra que o tratamento crônico com DEX aumentou significativamente a PAS (+13,1%), a PAD (+13,3%) e a PAM (+13,2%).

Por outro lado, 8 semanas de treinamento foram eficientes em atenuar o aumento da PAS, PAD e PAM, quando comparadas com o grupo SD (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros hemodinâmicos em todos os grupos analisados.

	SC	SD	TC	TD
PAS	123,8±2,5	140,0±2,5*	122,8±3,0	131,9±2,3*+
PAD	107,3±2,3	121,6±2,7*	103,0±5,7	106,4±3,4 ⁺
PAM	112,8±2,0	127,7±2,4*	109,6±4,7	114,9±2,8 ⁺
FC	371,6±10,8	386,0±8,7	373,2±12,6	383,6±10,8

Legenda da tabela 1: Pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), significa pressão arterial (PAM) e a frequência cardíaca (FC) (n=9-10). Significância: * vs controle e + vs sedentários, p < 0.05.

5. DISCUSSÃO

Os principais resultados deste estudo mostram que o pré-condicionamento físico aeróbio preveniu o desbalanço entre fatores angiogênicos e apoptóticos induzido pelo tratamento crônico com DEX na musculatura esquelética, o que contribuiu para a manutenção da microcirculação.

Apesar da DEX ser amplamente prescrita na clínica devido aos seus potentes efeitos anti-inflamatórios e antialérgicos, os efeitos de uma utilização exacerbada podem trazer diversas complicações que já estão bem estabelecidas na literatura, tais como perda de peso corporal, hiperglicemia, atrofia muscular e hipertensão (De Lellis Santos *et al.*, 2007; Barel *et al.*, 2010; Dionísio *et al.*, 2014b; Macedo *et al.*, 2014; Krug *et al.*, 2015). Os resultados do presente estudo revelam que, após o período de 14 dias tratamento com DEX, os animais apresentaram uma redução significativa de -7.0% no peso corporal, no entanto o pré-condicionamento físico dos animais não foi eficaz de prevenir e/ou atenuar essa perda de peso causada pela DEX. A ineficácia do treinamento físico nesta resposta já havia sido observada anteriormente, ou quando o treinamento físico era feito simultaneamente ao tratamento (Ahtikoski *et al.*, 2004; Pinheiro *et al.*, 2009) ou prévia e concomitante (Barel *et al.*, 2010; Dionísio *et al.*, 2014a). Nem mesmo quando o exercício era resistido esta resposta de redução de peso corporal foi evitada (Nicastro *et al.*, 2012; Macedo *et al.*, 2014; Krug *et al.*, 2015). Uma possível explicação, segundo alguns estudos, para esse efeito adverso nos animais tratados com DEX, é que ocorre uma redução da ingestão alimentar (De Lellis Santos *et al.*, 2007; Nicastro *et al.*, 2012; Macedo *et al.*, 2014), principalmente devido a uma alteração na liberação de dois peptídeos: a leptina, que desempenha importante papel na regulação da ingestão alimentar e no gasto energético e a grelina, produzida nas células do estômago, que está diretamente envolvida na regulação do balanço energético a curto prazo (Romero e Zanesco, 2006; Tulipano *et al.*, 2007).

Tem sido demonstrado que outro possível mecanismo para explicar a redução do peso corporal é a redução da massa muscular nos animais pelo tratamento com glicocorticóides, uma vez que a deleção do gene da miostatina evita a atrofia muscular e consequentemente o PC induzidos por glicocorticoides (Gilson *et al.*, 2007). Neste presente trabalho observamos uma redução do peso no músculo TA, que não foi atenuada

nos animais treinados previamente ao tratamento. No entanto o SOL e o miocárdio não foram alterados. Estes resultados estão de acordo com outros na literatura que demonstram uma atuação mais proeminente da DEX determinando atrofia em músculos de fibras brancas, glicolíticas, em comparação com as vermelhas, oxidativas (Falduto *et al.*, 1990; Nava *et al.*, 1996). Esta atrofia muscular foi comprovada pelas análises de área de secção transversa das fibras no músculo TA. A diminuição de perímetro das fibras musculares é um indício de atrofia muscular (Zhang *et al.*, 2004), a qual pode ser determinada por um desbalanço entre fatores positivos e negativos de proteínas que controlam o crescimento muscular (Lenk *et al.*, 2009; Macedo *et al.*, 2014; Krug *et al.*, 2015; Macedo *et al.*, 2015).

O objetivo principal deste presente estudo foi investigar os mecanismos induzidos pela DEX que poderiam alterar a microcirculação da musculatura esquelética e se o pré-condicionamento físico aeróbio poderia ser uma estratégia importante para atenuar esta resposta. Já é conhecido que a DEX reduz a densidade de capilares, e de fato, tem sido utilizada como terapia para a angiogênese patológica, como tumores, arteriosclerose e doenças dos olhos (neovascularização corneal) (Mirabelli *et al.*, 2014). Embora importante em situações patológicas, a redução na densidade de vasos é um efeito deletério indesejado pelo tratamento regular com DEX e os mecanismos responsáveis por esta resposta não são totalmente entendidos.

A dexametasona pode reduzir a densidade de vasos por alterar alguns componentes da via apoptótica, intrinsecamente, extrinsecamente ou ambos (Braun *et al.*, 2015). Normalmente, há um equilíbrio entre fatores anti-apotóticos e apoptóticos. Neste sentido, os resultados deste presente estudo demonstraram que a utilização crônica de DEX promoveu um desbalanço entre proteínas da família BCL-2, e esta alteração fica mais clara quando observamos a diminuição da razão entre BCL-2/BAX nos ratos tratados comparados aos não tratados e provavelmente esta alteração contribuiu para a rarefação presente na musculatura (TA). Tem sido demonstrado que o aumento da BAX induz a liberação do citocromo C da mitocôndria, o qual une-se ao apoptossomo (apaf-1). É então iniciado o processo das caspases, partindo das procaspases-9 até chegar a caspase-3, que por sua vez será clivada, sinalizando a célula endotelial para ser fagocitada por macrófagos (Sanz *et al.*, 2008). No presente trabalho, os níveis de caspase-3 clivada foram significativamente aumentados pelo tratamento com DEX. Portanto, a rarefação induzida pela DEX neste estudo pode ser explicada por uma combinação da diminuição

da razão entre BCL-2/BAX e também pelo aumento da caspase-3 clivada em ambos os músculos SOL e TA.

O fator de crescimento endotelial vascular é um dos mais potentes e específico fator angiogênico identificado (Ferrara, 2009). Já demonstramos que o tratamento com altas doses de DEX diminui os níveis de VEGF no músculo esquelético (Barel *et al.*, 2010) e neste presente trabalho, este resultado foi confirmado, mesmo com dose 20x mais baixa de DEX. O mecanismo responsável pela redução de VEGF após o tratamento de com DEX ainda não é conclusivo. Normalmente, a fosfolipase-A2 forma o ácido araquidônico, o qual é clivado pela COX-1 e COX-2. Estas enzimas formam vários produtos, como prostaglandina E2 (PGE₂), tromboxano e prostaciclina c. PGE₂, por sua vez, age em seus receptores EP₂ e EP₄ e determinam a formação de VEGF (Hori *et al.*, 2010). Existem evidências que a DEX suprime COX-2 (Hirasawa *et al.*, 2010), bem como a PGE₂ (Luo *et al.*, 2009). Com base nisso, investigamos a produção da proteína COX-2 no músculo TA, e observamos que a DEX reduziu significativamente os níveis de COX-2 no tecido muscular. Esse resultado nos permite sugerir que uma das possíveis causas na queda nos níveis de VEGF pode se dar pela diminuição da COX-2. Entretanto, o pré-condicionamento físico conseguiu prevenir a redução de COX-2. Vale destacar que os animais pré-condicionados que foram submetidos ao tratamento farmacológico mantiveram os níveis proteicos do VEGF, da razão entre BCL-2/BAX e da caspase-3 clivada. Além disso, tem sido apontado que o VEGF tem um importante papel como regulador da via apoptótica. Neste sentido, a redução de seus níveis pode contribuir para acelerar a progressão da apoptose das células endoteliais. O VEGF interage com seu receptor de tirosina quinase, VEGFR-2 que, via PI3/Akt, determina a fosforilação da proteína BAX, deixando a cascata apoptótica inativada (Sanz *et al.*, 2008). Assim, pode-se sugerir que ambos os processos (aumento dos fatores apoptóticos e diminuição das proteínas angiogênicas) poderiam estar contribuindo para a rarefação observada nos ratos tratados com DEX.

Os resultados do presente trabalho demonstraram, pela primeira vez, que os animais treinados que receberam o tratamento com baixas doses de DEX, apresentaram completa prevenção da rarefação observada nos animais sedentários, independentemente do tipo das fibras presente nos músculos, ou seja, tanto no TA como no SOL. Esta resposta estava associada a uma melhora no balanço entre proteínas apoptóticas (BAX e caspase-3 clivada) e as anti-apoptóticas, tais como BCL-2, p-BAX e VEGF.

Tem sido demonstrado que os efeitos benéficos do treinamento físico em melhorar o balanço entre fatores angiogênicos e apoptóticos podem contribuir para a prevenção de anormalidades na microcirculação em outros tipos hipertensão. Em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), o exercício restaurou os níveis proteicos de VEGF e BCL-2, além disso, os níveis proteicos da Bad diminuíram após treinamento de natação (Fernandes *et al.*, 2012), diferente dos nossos resultados.

O VEGF desempenha um importante papel na angiogênese induzida pelo exercício (Amaral *et al.*, 2001; Gavin *et al.*, 2007; Amaral e Michelini, 2011; Fernandes *et al.*, 2012). Os resultados do presente estudo não mostraram qualquer aumento adicional na produção de VEGF nos animais controles após treinamento físico. Esta resposta vai de encontro com a literatura que ressalta a importância do VEGF na angiogênese no início de um período de treinamento, no entanto, uma vez que a densidade de capilar no músculo é obtida, os níveis de VEGF retornam ao basal (Amaral *et al.*, 2008).

É bem sabido que o treinamento físico aeróbio é eficiente em diminuir a PA em indivíduos hipertensos (Macdonald *et al.*, 1999; Laterza *et al.*, 2007; Amaral e Michelini, 2011; Fernandes *et al.*, 2012) e, dentre os mecanismos propostos para esta resposta, está a redução da parede lúmen das arteríolas e o aumento da microcirculação na musculatura esquelética. No entanto, quase nada se sabe sobre os mecanismos associados à atenuação da PA em animais treinados e tratados com DEX. Este presente estudo avaliou os efeitos do treinamento físico na hipertensão induzida por DEX e demonstrou que o treinamento físico prévio, em esteira, atenuou significativamente o aumento da PA induzida pelo tratamento com DEX. Atualmente, os mecanismos responsáveis por este aumento em ratos tratados com DEX ainda são incertos, mas várias evidências estão associando com o mecanismo endotelial e produção de superóxido (Schäfer *et al.*, 2005; Mondo *et al.*, 2006; Roghair *et al.*, 2008; Ong e Whitworth, 2011). A rarefação, encontrada neste presente estudo, pode ser um outro possível mecanismo que poderia estar contribuindo para redução da resistência periférica e da PA após o tratamento com DEX, como já demonstrado em um trabalho que analisou o músculo cremaster (Vogt e Schmid-Schönbein, 2001). E, de fato, a diminuição na densidade de vasos tem sido associada com o aumento da pressão arterial em SHR (Amaral *et al.*, 2000; Fernandes *et al.*, 2012). Neste presente trabalho, a prevenção da diminuição do número de vasos, observada em ratos treinados, poderia ser um possível mecanismo responsável para a atenuação do aumento da PA nos ratos tratados com DEX

Em conclusão, os resultados deste presente estudo mostrou que o tratamento crônico com DEX causou o desequilíbrio entre fatores angiogênicos/apoptóticos na musculatura esquelética. No entanto, pela primeira vez, um trabalho demonstrou que o treinamento físico aeróbico foi capaz em manter o equilíbrio entre fatores angiogênicos e apoptóticos, o qual contribuiu para a manutenção da microcirculação na musculatura esquelética e, portanto, pode ter contribuído para a atenuação da hipertensão induzida pela DEX.

6. REFERÊNCIAS

AHTIKOSKI, A. et al. Regulation of type IV collagen gene expression and degradation in fast and slow muscles during dexamethasone treatment and exercise. **Pflügers Archiv**, v. 448, n. 1, p. 123-130, 2004. ISSN 0031-6768.

AIRES, M. D. M. Fisiologia. In: (Ed.). **Fisiologia**: Guanabara Koogan, 2012.

AMARAL, S.; MICHELINI, L. Effect of gender on training-induced vascular remodeling in SHR. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 9, p. 814-826, 2011. ISSN 0100-879X.

AMARAL, S. L. et al. Angiogenesis induced by electrical stimulation is mediated by angiotensin II and VEGF. **Microcirculation**, v. 8, n. 1, p. 57-67, 2001. ISSN 1073-9688.

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, p. 424-31, 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. **Journal of hypertension**, v. 18, n. 11, p. 1563-1572, 2000. ISSN 0263-6352.

BAREL, M. et al. Exercise training prevents hyperinsulinemia, muscular glycogen loss and muscle atrophy induced by dexamethasone treatment. **European journal of applied physiology**, v. 108, n. 5, p. 999-1007, 2010. ISSN 1439-6319.

BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O. Glicocorticóides: Usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. **Infarma**, v. 17, n. 7/9, p. 58-60, 2005.

BERNE, R. M.; KOEPPE, B. M.; STANTON, B. A. **Berne & Levy Physiology**. Elsevier Brasil, 2008. ISBN 0323045820.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular immunology**, v. 39, n. 11, p. 615-647, 2003. ISSN 0161-5890.

BRAUN, T. et al. Early dexamethasone treatment induces placental apoptosis in sheep. **Reproductive Sciences**, v. 22, n. 1, p. 47-59, 2015. ISSN 1933-7191.

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. 514-521, 2008. ISSN 0194-911X.

DE FÁTIMA, L. A.; DE CARVALHO PAPA, P. Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF): regulação transcricional e pós-transcricional. **Revista da Biologia**, 2010.

DE LELLIS SANTOS, C.; RAFACHO, A.; BOSQUEIRO, J. R. Efeitos da administração de dexametasona in vivo sobre glicemia, insulinemia e substratos circulantes são dependentes do tempo de tratamento. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 3, 2007. ISSN 1981-3163.

DIONÍSIO, T. et al. Aerobic training prevents dexamethasone-induced peripheral insulin resistance. **Hormone and metabolic research= Hormon-und Stoffwechselforschung= Hormones et métabolisme**, v. 46, n. 7, p. 484-489, 2014a. ISSN 0018-5043.

DIONÍSIO, T. et al. Aerobic training prevents dexamethasone-induced peripheral insulin resistance. **Hormone and metabolic research= Hormon-und Stoffwechselforschung= Hormones et métabolisme**, v. 46, n. 7, p. 484-489, 2014b. ISSN 0018-5043.

DOCHERTY, C. C. et al. Effect of in vivo fetal infusion of dexamethasone at 0.75 GA on fetal ovine resistance artery responses to ET-1. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 281, n. 1, p. R261-R268, 2001. ISSN 0363-6119.

FALDUTO, M. T.; CZERWINSKI, S. M.; HICKSON, R. C. Glucocorticoid-induced muscle atrophy prevention by exercise in fast-twitch fibers. **Journal of Applied Physiology**, v. 69, n. 3, p. 1058-1062, 1990. ISSN 8750-7587.

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. 513-520, 2012. ISSN 0194-911X.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 29, n. 6, p. 789-791, 2009. ISSN 1079-5642.

FERRARA, N.; GERBER, H.-P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature medicine**, v. 9, n. 6, p. 669-676, 2003.

FERRARA, N.; HENZEL, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 161, n. 2, p. 851-858, 1989. ISSN 0006-291X.

GAVIN, T. et al. Acute resistance exercise increases skeletal muscle angiogenic growth factor expression. **Acta physiologica**, v. 191, n. 2, p. 139-146, 2007. ISSN 1748-1716.

GERBER, H.-P.; DIXIT, V.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 21, p. 13313-13316, 1998. ISSN 0021-9258.

GILSON, H. et al. Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. **Endocrinology**, v. 148, n. 1, p. 452-460, 2007. ISSN 0013-7227.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. D. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. Elsevier Brasil, 2006. ISBN 8535216413.

HIRASAWA, N. et al. Involvement of prostaglandins and histamine in nickel wire-induced acute inflammation in mice. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 93, n. 4, p. 1306-1311, 2010. ISSN 1552-4965.

HO, Q. T.; KUO, C. J. Vascular endothelial growth factor: biology and therapeutic applications. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 7, p. 1349-1357, 2007. ISSN 1357-2725.

HOIER, B.; HELLSTEN, Y. Exercise-Induced Capillary Growth in Human Skeletal Muscle and the Dynamics of VEGF. **Microcirculation**, v. 21, n. 4, p. 301-314, 2014. ISSN 1549-8719.

HORI, R. et al. Role of prostaglandin E receptor subtypes EP2 and EP4 in autocrine and paracrine functions of vascular endothelial growth factor in the inner ear. **BMC neuroscience**, v. 11, n. 1, p. 35, 2010. ISSN 1471-2202.

IWAI, A. et al. Down-regulation of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma cells by glucocorticoids. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 226, n. 1, p. 11-17, 2004. ISSN 0303-7207.

Jl, E.-S. et al. Treadmill exercise inhibits apoptotic neuronal cell death with suppressed vascular endothelial growth factor expression in the retinas of the diabetic rats. **Journal of exercise rehabilitation**, v. 9, n. 3, p. 348, 2013.

JOÃO, P. R. D.; JUNIOR, F. F. Cuidados imediatos no pós-operatório de cirurgia cardíaca. **Jornal de Pediatria**, v. 79, n. Supl 2, 2003.

JUNG, S. Y. et al. Treadmill exercise reduces spinal cord injury-induced apoptosis by activating the PI3K/Akt pathway in rats. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 7, n. 3, p. 587-593, 2014. ISSN 1792-0981.

KIRWAN, J. R. The effect of glucocorticoids on joint destruction in rheumatoid arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 3, p. 142-147, 1995. ISSN 0028-4793.

KOEDAM, J. A.; SMINK, J. J.; VAN BUUL-OFFERS, S. C. Glucocorticoids inhibit vascular endothelial growth factor expression in growth plate chondrocytes. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 197, n. 1, p. 35-44, 2002. ISSN 0303-7207.

KRUG, A. L. et al. High-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy. **Muscle & nerve**, 2015. ISSN 1097-4598.

LATERZA, M. C. et al. Exercise training restores baroreflex sensitivity in never-treated hypertensive patients. **Hypertension**, v. 49, n. 6, p. 1298-1306, 2007. ISSN 0194-911X.

LENK, K. et al. Impact of exercise training on myostatin expression in the myocardium and skeletal muscle in a chronic heart failure model. **European journal of heart failure**, v. 11, n. 4, p. 342-348, 2009. ISSN 1879-0844.

LUO, J.-C. et al. Dexamethasone inhibits tumor necrosis factor- α -stimulated gastric epithelial cell migration. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 72, n. 10, p. 509-514, 2009. ISSN 1726-4901.

MACDONALD, J. R. et al. Hypotension following mild bouts of resistance exercise and submaximal dynamic exercise. **European journal of applied physiology and occupational physiology**, v. 79, p. 148-154, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10029335>>.

MACEDO, A. G. et al. Low-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced atrophy in the flexor hallucis longus muscle. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 143, p. 357-364, 2014. ISSN 0960-0760.

MACEDO, A. G. et al. Time-course changes of catabolic proteins following muscle atrophy induced by dexamethasone. **Steroids**, 2015. ISSN 0039-128X.

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). **Blood pressure**, v. 22, n. 4, p. 193-278, 2013. ISSN 0803-7051.

MARTINS JUNIOR, A.; GUIMARÃES, A. S.; FERREIRA, A. L. Efeito dos corticosteróides na cicatrização de anastomoses intestinais. **Acta cir. bras**, v. 7, n. 1, p. 28-30, 1992. ISSN 0102-8650.

MELO, R. M.; MARTINHO, E.; 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. 851-857, 2003. ISSN 0194-911X.

MIRABELLI, P. et al. Early effects of dexamethasone and anti-VEGF therapy in an inflammatory corneal neovascularization model. **Experimental eye research**, v. 125, p. 118-127, 2014. ISSN 0014-4835.

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. ISSN 0305-1870 (Print)

0305-1870 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17042910> >.

MOURA, S. A. et al. Local drug delivery system: Inhibition of inflammatory angiogenesis in a murine sponge model by dexamethasone-loaded polyurethane implants. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 100, n. 7, p. 2886-2895, 2011. ISSN 1520-6017.

NAKAO, S. et al. Larger Therapeutic Window for Steroid versus VEGF-A Inhibitor in Inflammatory Angiogenesis: Surprisingly Similar Impact on Leukocyte Infiltration Superior Therapeutic Window of Steroids. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 53, n. 7, p. 3296-3302, 2012. ISSN 1552-5783.

NAVA, S. et al. Effects of acute steroid administration on ventilatory and peripheral muscles in rats. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 153, n. 6, p. 1888-1896, 1996. ISSN 1073-449X.

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. 465-471, 2012. ISSN 0899-9007.

NICOSIA, R. F.; NICOSIA, S.; SMITH, M. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. **The American journal of pathology**, v. 145, n. 5, p. 1023, 1994.

ONG, S. L.; WHITWORTH, J. A. How do glucocorticoids cause hypertension: role of nitric oxide deficiency, oxidative stress, and eicosanoids. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 40, n. 2, p. 393-407, 2011. ISSN 0889-8529.

PINHEIRO, C. H. D. J. et al. Exercise prevents cardiometabolic alterations induced by chronic use of glucocorticoids. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 93, n. 4, p. 400-408, 2009. ISSN 0066-782X.

PIRPIRIS, M. et al. Pressor responsiveness in corticosteroid-induced hypertension in humans. **Hypertension**, v. 19, p. 567-574, 1992.

PLAVNIK, F. L. Hipertensão arterial induzida por drogas: como detectar e tratar. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 9, p. 185-191, 2002.

PRYOR, J. S.; MONTANI, J.-P.; ADAIR, T. H. Angiogenic growth factor responses to long-term treadmill exercise in mice. **Indian journal of physiology and pharmacology**, v. 54, n. 4, p. 309, 2010.

QIU, C.; BAYLIS, C. Dexamethasone worsens nitric oxide inhibition-induced hypertension and renal dysfunction. **American journal of hypertension**, v. 13, n. 10, p. 1097-1102, 2000. ISSN 0895-7061.

ROGHAIR, R. D. et al. Coronary constriction to angiotensin II is enhanced by endothelial superoxide production in sheep programmed by dexamethasone. **Pediatric research**, v. 63, n. 4, p. 370-374, 2008. ISSN 0031-3998.

ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**, p. 85-91, 2006. ISSN 1415-5273.

ROY, H.; BHARDWAJ, S.; YLÄ-HERTTUALA, S. Biology of vascular endothelial growth factors. **FEBS letters**, v. 580, n. 12, p. 2879-2887, 2006. ISSN 0014-5793.

SANZ, A. B. et al. Mechanisms of renal apoptosis in health and disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 19, n. 9, p. 1634-1642, 2008. ISSN 1046-6673.

SARUTA, T. Mechanism of glucocorticoid-induced hypertension. **Hypertension Research**, v. 19, n. 1, p. 1-8, 1996. ISSN 0916-9636.

SCHÄCKE, H.; DÖCKE, W.-D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & therapeutics**, v. 96, n. 1, p. 23-43, 2002. ISSN 0163-7258.

SCHÄFER, S. et al. Dexamethasone suppresses eNOS and CAT-1 and induces oxidative stress in mouse resistance arterioles. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, n. 1, p. H436-H444, 2005. ISSN 0363-6135.

SEVERINO, C. et al. Low-dose dexamethasone in the rat: a model to study insulin resistance. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 283, n. 2, p. E367-E373, 2002. ISSN 0193-1849.

SILVA, G. J. J. et al. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 30, n. 3, p. 714-719, 1997. ISSN 0194-911X.

TRAN, E. D.; SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. An In-Vivo Analysis of Capillary Stasis and Endothelial Apoptosis in a Model of Hypertension. **Microcirculation**, v. 14, n. 8, p. 793-804, 2007. ISSN 1549-8719.

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. 267-274, 2007. ISSN 1386-341X.

VOGT, C. J.; SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. Microvascular endothelial cell death and rarefaction in the glucocorticoid-induced hypertensive rat. **Microcirculation**, v. 8, n. 2, p. 129-139, 2001. ISSN 1549-8719.

YANG, M.; ARAGON, M.; MURFEE, W. L. Angiogenesis in mesenteric microvascular networks from spontaneously hypertensive versus normotensive rats. **Microcirculation**, v. 18, n. 7, p. 574-582, 2011. ISSN 1549-8719.

ZHANG, Y. et al. The antioxidant tempol prevents and partially reverses dexamethasone-induced hypertension in the rat. **American journal of hypertension**, v. 17, n. 3, p. 260-265, 2004. ISSN 0895-7061.