

**TRATAMENTO CRÔNICO COM DECANOATO DE NANDROLONA
PROMOVE REMODELAMENTO CARDÍACO E ALTERAÇÃO DA
FUNÇÃO VENTRICULAR ESQUERDA EM RATAS: PAPEL DOS
MODULADORES INTRACELULARES DE Ca^{2+}**

ANDREWS MARQUES DO NASCIMENTO

Doutorado em Ciências Fisiológicas

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**VITÓRIA
2017**

**TRATAMENTO CRÔNICO COM DECANOATO DE NANDROLONA
PROMOVE REMODELAMENTO CARDÍACO E ALTERAÇÃO DA
FUNÇÃO VENTRICULAR ESQUERDA EM RATAS: PAPEL DOS
MODULADORES INTRACELULARES DE Ca²⁺**

Tese apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador (a): Dr^a Nazaré Souza Bissoli

Co-orientador: Dr. Tadeu Uggere de Andrade.

ANDREWS MARQUES DO NASCIMENTO

Doutorado em Ciências Fisiológicas

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**VITÓRIA
2017**

ANDREWS MARQUES DO NASCIMENTO

TRATAMENTO CRÔNICO COM DECANOATO DE NANDROLONA PROMOVE REMODELAMENTO CARDÍACO E ALTERAÇÃO DA FUNÇÃO VENTRICULAR ESQUERDA EM RATAS: PAPEL DOS MODULADORES INTRACELULARES DE Ca^{2+}

Tese apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em de março de 2017,

Banca Examinadora:

Dr^a Denise Coutinho Endringer (UVV)

Dr Jones Bernardes Graceli (UFES)

Dr Rogerio Faustino Ribeiro Junior (UFES)

**Dr Tadeu Uggere de Andrade (UVV)
(Co-orientador)**

**Dr^a Nazaré Souza Bissoli (UFES)
(Orientadora)**

**Dr^a Alessandra Simão Padilha (UFES)
(Coordenadora)**

Dedicado esta tese primeiramente a Deus, por me capacitar e pelo dom da vida. Aos meus pais que dignamente me apresentaram à importância da família e honestidade, além de toda dedicação e carinho. Aos meus orientadores Nazaré e Tadeu pelos ensinamentos e incentivos. A minha namorada pelo apoio, compreensão e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por guiar meus passos e pela presença constante em minha vida, dando forças para seguir sempre em frente.

Agradeço a minha família, o alicerce de minha vida: meus pais, Giovani e Silvana, pelo eterno cuidado, dedicação e amor; pelo apoio nos momentos difíceis e de inquietantes decisões; por estarem ao meu lado a cada passo, a cada pequena conquista e grandes realizações, pois estes não teriam valor se vocês não estivessem comigo.

A minha namorada Taciana, por todo amor e dedicação, me sinto grato em te-la em minha vida, compartilhando todos os momentos e por estar sempre comigo. Obrigado!

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Nazaré Souza Bissoli por ter me recebido e acolhido tão bem em seu laboratório. Obrigado pelos ensinamentos científicos e pessoais, aprendidos com a convivência em laboratório e em viagens (vale a pena ressaltar). Pela confiança, dedicação e incentivo, além de estar sempre disposta a nos auxiliar. Obrigado!

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade, amigo e exemplo de orientador, que tenho grande respeito e admiração, sou grato e me sinto privilegiado em conhecê-lo desde a graduação, seus ensinamentos desde então até a postura na vida profissional e acadêmica são de valor inestimável.

A Ewelyne que me acompanha desde a graduação, uma grande amiga. Obrigado por toda ajuda, pela dedicação e companheirismo. Meu especial agradecimento pelas contribuições e incentivos.

A Girlandia, que esteve presente no decorrer do mestrado e doutorado, se tornando uma grande amiga.

Aos meus amigos, que se fizeram presente em minha vida, tornando-a mais agradável e feliz, obrigado pelo apoio e carinho.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (PPGCF-UFES) por contribuir com todo conhecimento e estrutura necessária para a realização deste trabalho e o incentivo à pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo – FAPES, pela concessão da bolsa de doutorado e financiamento do projeto, respectivamente, fundamentais

para concretizar esse estudo e para meu aperfeiçoamento profissional.

A todos os alunos de Laboratório de Hipertensão Experimental (LHE), alunos de Iniciação científica e colegas do PPGCF-UFES, pelos conhecimentos e momentos compartilhados no decorrer desse tempo, sempre com muito bom humor.

A todos que contribuíram de alguma forma, na realização deste trabalho, exponho aqui meu sincero agradecimento!

“Em seu coração o homem planeja o seu
caminho, mas o Senhor determina os seus
passos”.

Provérbios 16:9

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Justificativa	17
1.2	Revisão de literatura	20
1.2.1	Esteróides anabólicos androgênicos	20
1.2.2	Influência dos EAA no sistema cardiovascular	28
1.2.3	Função cardíaca	33
1.2.4	Exercício físico	40
2	OBJETIVOS	44
2.1	Objetivo geral	44
2.2	Objetivos específicos	44
3	MÉTODOS	45
3.1	Animais experimentais	45
3.2	Exercício físico resistido	46
3.3	Avaliação do ciclo estral pelo esfregaço vaginal	48
3.4	Avaliação da pressão arterial média e Frequência cardíaca	49
3.5	Avaliação da Função cardíaca	50
3.6	Retirada dos tecidos e análise histológica	51
3.7	Dosagem dos níveis plasmáticos de 17 β -Estradiol e Testosterona	52
3.8	Determinação dos níveis proteicos por Western blot	53
3.9	Análise estatística	54
4	RESULTADOS	55
4.1	Avaliação dos parâmetros ponderais	55
4.2	Efeito da atividade física	57
4.3	Efeito do tratamento com DN e/ou exercício físico resistido sobre os parâmetros histológicos de ratas	58
4.3.1	Avaliação da hipertrofia cardíaca	58
4.3.2	Avaliação da deposição de colágeno no tecido cardíaco	60
4.4	Efeito do tratamento com decanoato de nandrolona e/ou exercício físico resistido sobre os parâmetros cardiovasculares e da função ventricular esquerda	62
4.4.1	Avaliação da pressão arterial média e frequência cardíaca	62
4.4.2	Avaliação da pressão sistólica do ventrículo esquerdo	63
4.4.3	Avaliação da contratilidade do ventrículo esquerdo	64
4.4.4	Avaliação do relaxamento do ventrículo esquerdo	64
4.5	Avaliação da expressão das proteínas envolvidas no transiente de Ca ²⁺	65
4.5.1	Expressão proteica da SERCA-2a no ventrículo esquerdo	65

4.5.2	Expressão proteica do PLB no ventrículo esquerdo.....	66
4.5.2	Expressão proteica da NCX no ventrículo esquerdo.....	67
4.6	Avaliação dos níveis hormonais.....	68
5	DISCUSSÃO	69
6	CONCLUSÃO	80
7	REFERENCIAS	81
8	ANEXOS	112

LISTA DE FIGURAS

1	Principais modificações estruturais realizadas na molécula da testosterona e que culminaram na síntese dos esteroides anabólicos androgênicos.....	19
2	Estrutura química e modificações estruturais das moléculas de testosterona, nandrolona, decanoato de nandrolona e diidronandrolona.....	20
3	Esquema do mecanismo genômico e não genômico dos EAA.....	23
4	Esquema representativo da diferenciação dos tipos de hipertrofia cardíaca concêntrica e excêntrica.....	30
5	Diagrama de Wiggers, mostrando os eventos do ciclo cardíaco que ocorrem no ventrículo esquerdo.....	32
6	Estrutura da bomba do retículo sarcoplasmático ATPase 2 (SERCA-2a) em diferentes concentrações de cálcio (Ca^{2+}) citosólico.....	35
7	Transporte de Ca^{2+} em miócitos ventriculares. Base molecular e estrutural relacionada com o mecanismo básico excitação e contração cardíaca.....	37
8	Representação da divisão dos grupos experimentais.....	44
9	Representação do modelo experimental de exercício físico resistido.	45
10	Representação da variação hormonal durante o ciclo estral e esfregaço vaginal em microscópio ótico	47
11	Representação esquemática da cirurgia de canulação do ventrículo esquerdo por meio da artéria carótida direita.....	49
12	Valores do ganho de massa corporal de ratas tratadas com DN e/ou submetidas a exercício físico resistido.....	54
13	Avaliação da hipertrofia muscular e eficiência anabólica do DN, pela razão massa do gastrocnêmio/comprimento da tíbia nos diferentes grupos de tratamento.....	55
14	Análise histológica do ventrículo esquerdo para avaliação da Hipertrofia cardíaca.....	57
15	Análise histológica do ventrículo esquerdo para avaliação da deposição de colágeno cardíaco.....	59
16	Avaliação da pressão sistólica do ventrículo esquerdo.....	60
17	Avaliação da pressão sistólica do ventrículo esquerdo.....	61
18	Avaliação da função diastólica do ventrículo esquerdo.....	62
19	Expressão proteica da SERCA-2a em ventrículos esquerdos.....	63
20	Expressão proteica da fosfolambam em ventrículos esquerdos.	64
21	Expressão proteica do Trocador Na^{+}/Ca^{2+} (NCX) em ventrículos esquerdos.	65
22	Resumo dos resultados.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

+dP/dt_{máx} - Valores máximos da primeira derivada da pressão ventricular esquerda

-dP/dt_{min} - Valores mínimos da primeira derivada da pressão ventricular esquerda

AD - Átrio Direito

AMPC - Monofosfato de Adenosina cíclico

ANOVA - Análise de Variância de uma Via

C - Grupos Controle

Ca²⁺ - cátion Cálcio

CAM - Calmodulina

CaMKII - Ca²⁺-Calmodulina quinase tipo-2

CE - Grupo Controle Submetido a Exercício Físico Resistido

CEBRID - Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas

DHEA - Deidroepiandrosterona

DHN - 5 α -diidronandrolona

DHT - Diidrotestosterona

DN - Decanoato de Nandrolona

E2- 17 β -Estradiol

EAA - Esteroides Anabólicos Androgênicos

ECA – Enzima conversora de angiotensina

ER - Exercício Resistido

ERA - Elementos de Resposta ao Hormônio Androgênico

FC - Frequência Cardíaca

GAPDH - Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase

GP - Proteína G

H&E–Hematoxilina e Eosina

IP3 - Inositol 1,4,5-Trifosfato

MAPK - Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

MRA - Receptores Androgênicos de Membrana

NCX - Trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

ND – Grupo Tratado com Decanoato de Nandrolona

NDE - Grupo Tratado com Decanoato de Nandrolona com Associação de Exercício Físico Resistido

PA - Potencial de Ação

PAM - Pressão Arterial Média

PKA - Proteína Quinase A

PKC – Proteína Quinase C

PLB - Fosfolambam

PLB total – Fosfolambam total

PLC - Fosfolipase C

PSVE – Pressão Sistólica do Ventrículo Esquerdo

p-PLB – PLB Fosforilada

RA - Receptores Androgênicos

RC - Remodelamento Cardíaco

RS - Retículo Sarcoplasmático

RSJ - Retículo Sarcoplasmático Juncional

RSR - Retículo Sarcoplasmático Rede

RyR2 - Receptores de Rianodina tipo-2

SERCA-2a – isoforma do retículo sarcoplasmático ATPase 2

SLN - Sarcolipina

Tau - Constante de tempo do relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo

TGF- β - Fator de transformação do crescimento β

TnC - Troponina C

TnI - Troponina I

VE – Ventrículo izquierdo

LISTA DE TABELAS

- 1 Parâmetros ponderais finais (g) das ratas tratadas e/ou submetidas a exercício físico resistido por 4 semanas..... 53
- 2 Valores de lactato sanguíneo e número de saltos por minuto dos grupos submetidos ao exercício físico resistido..... 56
- 3 Valores de testosterona e estrogênio séricos das ratas tratadas e/ou submetidas a exercício físico resistido por 4 semanas..... 66

RESUMO

NASCIMENTO, A.M. **Tratamento crônico com decanoato de nandrolona promove remodelamento cardíaco e alteração da função ventricular esquerda em ratas: papel dos moduladores intracelulares de Ca^{2+} .** Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas. Vitória, 2017.

O uso dos esteróides anabólicos androgênicos (EAA) tem crescido consideravelmente nas últimas décadas, sendo utilizada tanto por homens como por mulheres, com redução significativa na idade inicial destes utilizadores. O uso abusivo e indiscriminado destes hormônios acarreta alterações cardiovasculares, como hipertrofia cardíaca associada com deposição de colágeno, considerada patológica. Este remodelamento cardíaco causado pelos EAA pode desencadear hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, cardiomiopatia, arritmias e até morte súbita. O uso de EAA é geralmente realizado em associação com o exercício físico, que isoladamente promove efeitos cardiovasculares benéficos, todavia em associação perde-se o efeito benéfico do exercício, com a ocorrência de adaptações cardiovasculares desfavoráveis e função ventricular comprometida, especialmente função diastólica, fibrose miocárdica e desarranjo de cardiomiócitos. Além disso, pouco se sabe sobre os efeitos cardiovasculares dessas drogas no sexo feminino. Este trabalho objetiva avaliar os efeitos do decanoato de nandrolona (DN) e do exercício físico resistido sobre a contratilidade cardíaca em ratas. Os animais foram separados em quatro grupos: C (não treinados); CE (submetidos a exercício físico resistido em água, cinco vezes por semana); ND (tratados com DN, 20 mg/kg/semana durante quatro semanas); e NDE (treinados e tratados). Os parâmetros hemodinâmicos ($+\text{dP}/\text{dt}_{\text{máx}}$, $-\text{dP}/\text{dt}_{\text{min}}$ e Tau) foram avaliados no ventrículo esquerdo. O coração foi coletado para análise histológica (H&E) e deposição de colágeno (picosírius *red*). A análise da expressão das proteínas relacionadas com o transiente de Ca^{2+} citosólico foi realizada pelo método de Western blot. Os animais tratados com DN e os animais submetidos ao treinamento físico resistido apresentaram aumento na contratilidade e relaxamento cardíaco. Além disso, o DN promoveu aumento na expressão da fosfolambam fosforilada (p-PLB) e isoforma do retículo sarcoplasmático ATPase 2 (SERCA-2a), enquanto o exercício de resistência aumentou a fosforilação de PLB e a expressão do trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). O remodelamento cardíaco patológico, característico pela hipertrofia cardíaca associada com deposição de colágeno, foi observado após o tratamento com DN. Portanto, tratamento com DN e o exercício físico resistido em fêmeas, por um período de quatro semanas, foram capazes de promover hipertrofia cardíaca e aumentar a função cardíaca, alterando proteínas responsáveis pela regulação de Ca^{2+} intracelular, entretanto, a hipertrofia causada pela nandrolona foi considerada patológica. Certamente, esta avaliação comparando o uso de nandrolona e a contratilidade cardíaca deve ser posteriormente investigada, especialmente com uso mais prolongado, visto que as exacerbações prolongadas desses efeitos podem desencadear complicações cardíacas graves.

Palavras-chave: Decanoato de nandrolona; exercício resistido; contratilidade cardíaca e proteínas reguladoras de cálcio.

ABSTRACT

NASCIMENTO, A.M. **Chronic treatment with nandrolone decanoate promotes cardiac remodeling and left ventricular function alteration in rats: role of intracellular modulators of Ca²⁺**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas. Vitória, 2017.

The use of androgenic anabolic steroids (AAS) has grown considerably in the last decades, being used by both men and women, with a significant reduction in the age of these users. The abusive and indiscriminate use of these hormones causes cardiovascular alterations, such as cardiac hypertrophy associated with collagen deposition considered pathological. This cardiac remodeling caused by AAS can trigger hypertension, congestive heart failure, cardiomyopathy, arrhythmias and even sudden death. Usually, AAS are associated with physical exercise, which alone promotes beneficial cardiovascular effects. However, in combination, the beneficial effect of exercise is lost with the occurrence of unfavorable cardiovascular adaptations and ventricular function problems, especially diastolic function, myocardial fibrosis and cardiomyocyte derangement. In addition, little is known about the cardiovascular effects of these drugs on women. This work aims to evaluate the effects of nandrolone decanoate and resistive physical exercise on cardiac contractility in female rats. The animals were separated into 4 groups: C (untrained); EC (submitted to resistive physical exercise in water, 5 times per week); ND (treated with DN, 20 mg/kg/ week for 4 weeks); and NDE (trained and treated). The hemodynamic parameters (+dP/dt_{max}, -dP/dt_{min} and Tau) were evaluated in the left ventricle. The heart was collected for histological analysis (H&E) and deposition of collagen (picrusirius red). Analysis of the expression of proteins related to cytosolic Ca²⁺ handling was performed by the Western blot method. Animals treated with nandrolone and animals submitted to resistance training showed increased contractility and cardiac relaxation. Furthermore, the nandrolone increased the expression of the phosphorylated phospholamban (p-PLB) and isoform of the sarcoplasmic reticulum ATPase 2 (SERCA-2a), while resistance exercise increased the phosphorylation of PLB and exchanger expression of Na⁺/Ca²⁺ (NCX). Pathologic cardiac remodeling, characteristic of cardiac hypertrophy associated with collagen deposition, was observed after nandrolone treatment. Therefore, treatment with nandrolone and resistive physical exercise in females, for a period of four weeks, were able to promote cardiac hypertrophy and increase cardiac function by altering proteins responsible for the regulation of intracellular Ca²⁺. However, hypertrophy caused by nandrolone was considered a pathological condition. Certainly, this evaluation comparing the use of nandrolone and cardiac contractility should be further investigated, especially with chronic use, since prolonged exacerbations of these effects may trigger severe cardiac complications.

Key words: Nandrolone decanoate, resistive exercise, cardiac contractility and calcium handling.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa

O uso de esteróides anabólicos androgênicos (EAA) tem crescido consideravelmente nas últimas décadas tanto por homens como por mulheres, com redução significativa na idade de utilizadores (Evans, 2004; Bojsen-Møller e Christiansen, 2010). Um estudo de Miller et al. (2005) conduzido nos Estados Unidos, evidenciou que a utilização de EAA foi de 4% e 2% em jovens do sexo masculino e feminino, respectivamente, indicando que o abuso destes hormônios já não se restringe aos homens em fase adulta e que cada vez mais cedo ocorre a utilização. O uso abusivo e indiscriminado dos hormônios pode acarretar complicações cardiovasculares graves, muitas delas bem referidas e conhecidas na literatura científica, com destaque para hipertrofia cardíaca, hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, cardiomiopatia, arritmias e até morte súbita (Liu et al., 2003; Fineschi et al., 2007). A hipertrofia cardíaca causada pelos EAA é evidenciada por ser uma hipertrofia de caráter patológico, na qual ocorrem alterações nas miofibrilas, bem como o inchaço e alongamento mitocondrial do miocárdio, indicando os estágios iniciais da insuficiência cardíaca (Melchert e Welder, 1995; Pereira-Junior et al., 2006).

Pesquisas do nosso grupo mostraram a influência de altas doses de decanoato de nandrolona (DN), um dos mais conhecidos e utilizados EAA, no sistema cardiovascular. Esses estudos demonstraram que o uso crônico de nandrolona em ratos sedentários prejudicou o reflexo Bezold-Jarisch (Andrade et al., 2008), induziu hipertrofia cardíaca e aumento da pressão arterial em animais, com a participação nesses processos do sistema renina angiotensina (SRA) (Franqui et al., 2013). Outra observação relevante também observada pelo nosso

grupo foi que a hipertrofia cardíaca causada pelo DN, estava associada ao aumento da deposição de colágeno na matriz extracelular e ao desequilíbrio das citocinas cardíacas, com a prevalência de citocinas pró-inflamatórias (Franqui et al., 2013).

Estímulos como o exercício também promovem hipertrofia cardíaca. No entanto, no caso do exercício, este processo é benéfico e adaptativo em resposta a aumento na carga mecânica (Lorell e Carabello, 2000). O uso de EAA é geralmente associado com o exercício na prática esportiva. Entretanto, o efeito benéfico do exercício parece ser perdido, com a ocorrência de adaptações cardiovasculares desfavoráveis (Melchert e Welder, 1995) e função ventricular comprometida, especialmente função diastólica, fibrose miocárdica e desarranjo de cardiomiócitos (Yamamoto et al., 2002).

A hipertrofia fisiológica está associada ao aumento da eficiência dos processos de contração muscular, devido ao aumento das proteínas contráteis (Kraemer et al., 2002). Para o processo de contração cardíaca, o Ca^{2+} é um componente regulador chave atuando como um regulador de sinal elétrico que determina acoplamento excitatório de frequência cardíaca e contração. A redução dos níveis intracelulares de Ca^{2+} e a diminuição da atividade da bomba de cálcio podem ser alterações encontradas em corações com hipertrofia cardíaca patológica e insuficientes (Dash et al., 2001; Orchard e Brette, 2008; Adachi, 2010). Além disso, a regulação citosólica do cálcio contribui não só para a contratilidade cardíaca, mas também para o relaxamento cardíaco, e esse ajuste ocorre por meio dos canais para Ca^{2+} , das bombas ATPase, dos trocadores cardíacos, dos transportadores e da ligação das proteínas ao Ca^{2+} . Os trocadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) e a isoforma do retículo sarcoplasmático/retículo

endoplasmático ATPase 2 (SERCA-2a) são responsáveis pela extrusão e recaptação de cálcio, respectivamente (Bers, 2001).

Existe uma clara preocupação com o uso de EAA tanto por homens quanto por mulheres (Braunstein, 2007; Sirianni et al., 2012), porém não houve estudos avaliando a influência dessas substâncias sobre a contratilidade cardíaca em fêmeas (Rocha et al., 2007). Portanto, nossa hipótese é que a utilização do decanoato de nandrolona pode interferir na função cardíaca por alterar a regulação citosólica de Ca^{2+} . Adicionalmente, visto que existem efeitos cardioprotetores do exercício, é possível que os efeitos deletérios do DN, em suas ações.

1.2 Revisão de literatura

1.2.1 Esteróides anabólicos androgênicos

Os EAA são hormônios sintéticos, derivados da testosterona (Handa e Price, 2000), que promovem dois efeitos principais: o primeiro são os efeitos androgênicos (termo derivado do grego *androgennan*, onde *andro* significa homem e *gennan*, significa produzir), relacionados com a função reprodutora e com as características sexuais secundárias masculina. O segundo são os efeitos anabólicos, responsáveis por promover crescimento e maturação de outros tecidos (Handa e Price, 2000; Berne e Levy, 2000).

A relação entre os efeitos anabólicos e androgênicos pode variar significativamente entre os tipos de EAA, visto que diversas modificações estruturais moleculares foram realizadas na tentativa de separar estes efeitos, mesmo com o objetivo não alcançado foram desenvolvidos compostos menos androgênicos e mais anabólicos (Binayi et al., 2016). Estas modificações possibilitam e contribuem para a utilização dos EAAs por atletas e indivíduos que buscam melhorar a aparência física, com aumento da musculatura, porém com a masculinização reduzida (Tanner, Miller e Alongi, 1995; Kuhn, 2002).

Em função das modificações moleculares sofridas pela testosterona, várias substâncias foram desenvolvidas, que podem ser divididas em diferentes classes de EAA (Figura 1), com propriedades específicas, sendo eles os esteroides 17 α -substituídos (podem ser administrados oralmente), 17 β -alquilados (utilizados por via parenteral, com tempo de ação variável, dependendo do grupo substituinte), 17 β -esterificados (maior tempo de ação, pela substituição com ácido graxo) e esteroides com modificações nos anéis A, B e C (diversas alterações farmacológicas, dentre eles maior afinidade pelos RA e resistência à aromatização)(Shahidi, 2001; Kuhn,

2002; Kicman, 2008).

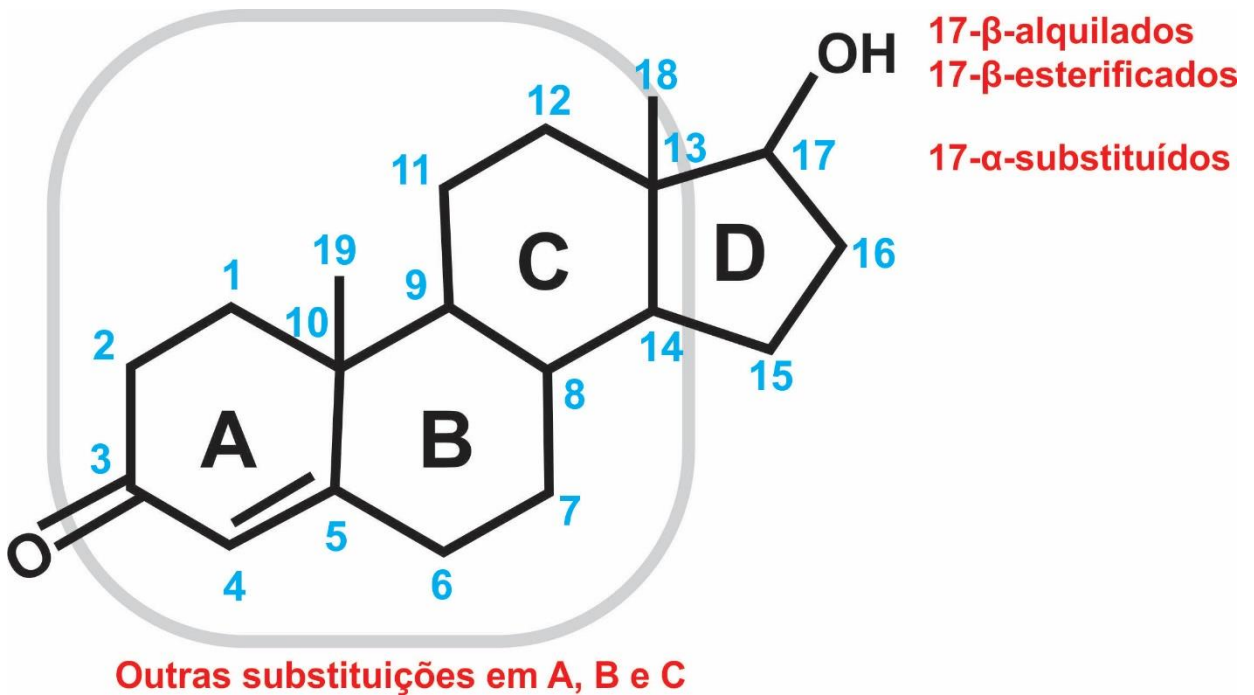


Figura 1. Síntese das diferentes modificações estruturais realizada na molécula da testosterona e que culminaram na síntese dos esteroides anabólicos androgênicos. As principais modificações estruturais, ocorrem nos Anéis A, B e C, e Carbono 17 (C17) do anel D. Adaptado de Kicman, 2008 e Kuhn, 2002.

O Decanoato de Nandrolona (19-nor-4-androstenedien-17-β-ol-3-ona ou Decanoato de 19-nortestosterona) é o mais utilizado e estudado EAA, sendo derivado da nandrolona (19-nortestosterona) após sofrer esterificação com o ácido decanóico no carbono 17, substituindo a hidroxila (Figura 2) (Wan Der Vies, 1965; Kutscher, Lund e Perry, 2002). A esterificação no carbono 17 possibilita a aplicação intramuscular e prolonga o efeito, durando de duas a três semanas, devido à formação de depósitos (Shahidi, 2001; Kutscher, Lund e Perry, 2002). Além disso, o DN não apresenta metil substituinte na posição 19 da molécula, devido a desmetilação, esta modificação confere ao DN maior afinidade pelos receptores androgênicos (RA), quando comparado com a testosterona (Celotti e Cesi, 1992; Tylicki et al., 2007). No organismo o DN sofre hidrólise do ester e recupera a

hidroxila no carbono 17, retornando a sua forma ativa, a nandrolona (Tylicki et al., 2007).

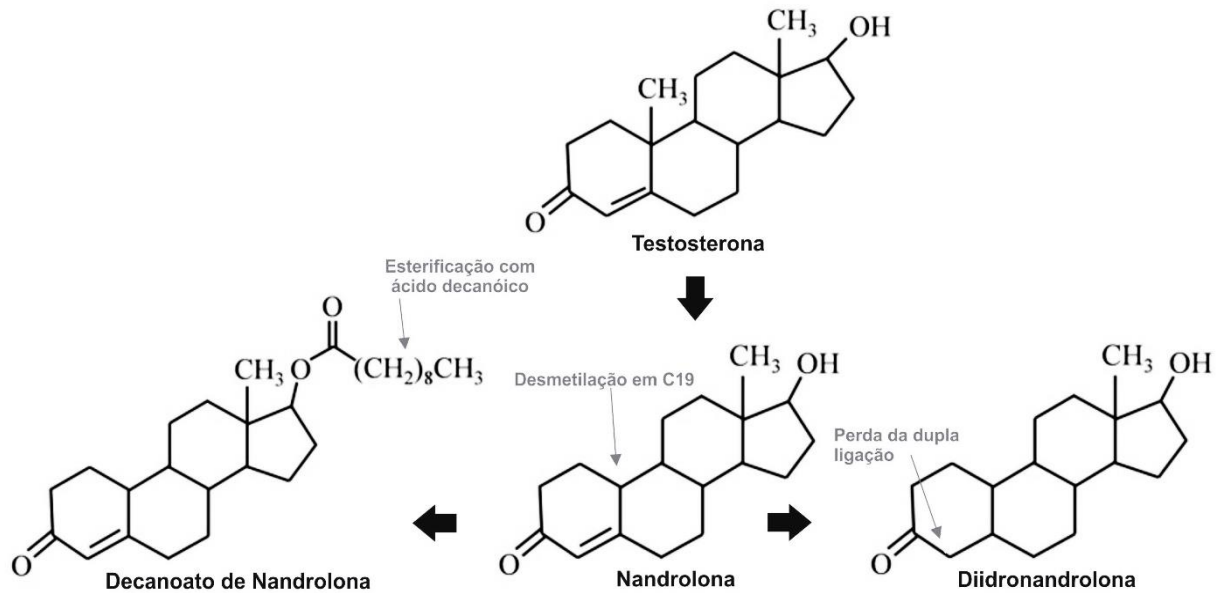


Figura 2. Estrutura química e modificações estruturais das moléculas de testosterona, nandrolona, decanoato de nandrolona e diidronandrolona. Figura do acervo do LHE, elaborada por Andrews Marques do Nascimento, 2017.

A excessiva utilização do DN se dá, principalmente, pela maior capacidade anabólica e aos efeitos androgênicos reduzidos, quando comparados à testosterona (Revisado por Kicman, 2008). Estudos sugerem que esta redução dos efeitos androgênicos da nandrolona em relação à testosterona, está relacionada com a enzima 5 α -redutase que converte a nandrolona em 5 α -diidronandrolona (DHN) (Toth e Zakár, 1982). Ao contrário da testosterona, que ao ser convertida em diidrotestosterona (DHT) aumenta a afinidade pelos RA, a nandrolona ao ser convertida em DHN liga-se mais fracamente aos RA, por perder a dupla ligação no anel A (Toth e Zakár, 1982; Celotti e Cesi, 1992). Os metabólitos formados pela 5 α -redutase são responsáveis pelos efeitos androgênicos, tecidos com pouca atividade desta enzima sofrem menos ação androgênica, como ocorre nos músculos. A

nandrolona possui maior afinidade pelos receptores de esteroides, produzindo efeitos anabólicos superiores à testosterona (Wilson, 1988; Celotti e Cesi, 1992).

Outra característica importante da nandrolona, apesar de controversa, é a capacidade de não sofrer aromatização em estrogênio pela enzima aromatase (Hobbs, Jones e Plymate, 1996; Kuhn, 2002; Bordbar et al., 2014) conferindo assim menos efeitos feminilizante indesejáveis, principalmente com a utilização prolongada e em doses elevadas (Kuhn, 2002).

Os hormônios esteroides podem exercer seus efeitos por dois possíveis mecanismos, sendo eles a via genômica e a via não genômica (Figura 3) (Foradori et al., 2008). Porém, independentemente do mecanismo de ação dos EAA ao promoverem seus efeitos, ocorre a participação dos receptores androgênicos (RA), que podem ser encontrados em vários locais no organismo, como no coração, aparelho reprodutor, nos ossos, tecidos musculares, cérebro, próstata, fígado, rins e adipócitos (Wilson, 1988).

Em função da característica lipídica das estruturas químicas dos hormônios esteroides, essas substâncias atravessam com facilidade a membrana plasmática, esta característica possibilita a realização de suas ações pelo mecanismo clássico, conhecido como genômico (Falkenstein et al., 2000; Vasconsuelo et al., 2011). Nesse mecanismo de ação, o hormônio após atravessar a bicamada lipídica da membrana plasmática e interagir com o RA, forma um complexo hormônio-receptor que é translocado para o núcleo, onde se liga ao DNA, em uma região específica denominados elementos de resposta ao hormônio androgênico (ERA) podendo promover a transcrição de elementos específicos do DNA, culminando em uma resposta androgênica e/ou anabólica (Falkenstein et al., 2000; Shahidi, 2001). Deve-se salientar que a utilização dos EAA promove alterações intracelulares por meio

dos RA, via genômica ou não genômica, impossibilitando dissociá-los (Berne e Levy, 2000). A participação dos RA no aumento de síntese proteica e ganho de massa muscular, já está bem estabelecida na literatura. Sabe-se ainda que estes receptores se encontram saturados de testosterona, em níveis fisiológicos, em homens com função gônadal normal. No entanto, estes receptores podem sofrer redução em número, quando doses supra fisiológicas de EAA são administradas, processo conhecido como *down-regulation* (Bricout et al., 1994; Doumit et al., 1996; Sheffield-Moore et al., 1999; Kadi et al., 2000). O mecanismo genômico favorece uma ação em longo prazo dos hormônios, que se iniciam horas após o contato entre hormônio e o receptor, e perdura por vários dias após a interrupção (Diamond et al., 1990; Norman et al., 2004).

A via não genômica, também denominada não clássica, é uma via caracterizada pela ação rápida de segundos a minutos (Kousteni et al., 2001), na qual ocorre ativação de segundos mensageiros celulares para propagação celular do sinal (Falkenstein et al., 2000). Apesar de menos elucidada que a via genômica, esta via se mostra muito importante para que os hormônios exerçam algumas ações intracelulares, como o aumento rápido do cálcio citosólico e o envolvimento com a indução de morte celular por apoptose (Vicenzio et al., 2006; Michels et al., 2006; Cavalari et al. 2012).

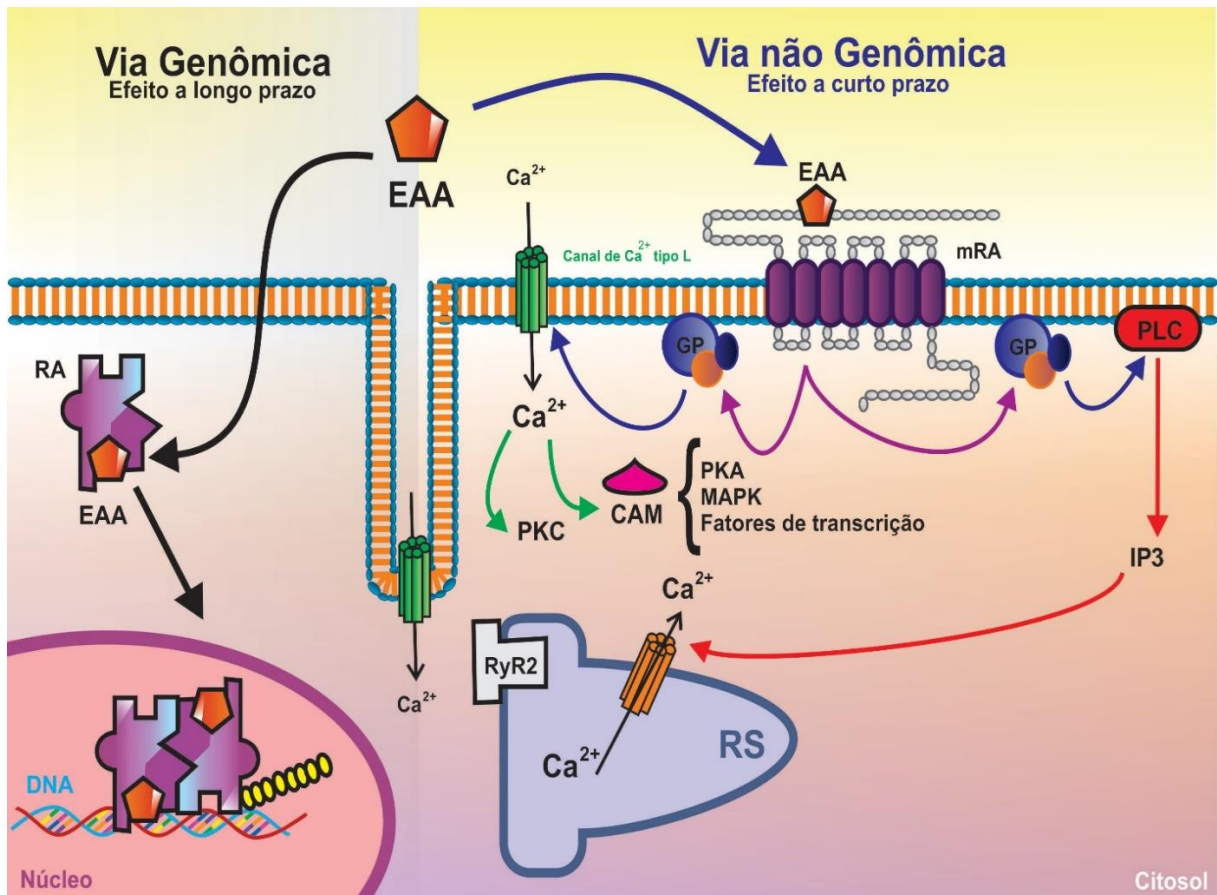


Figura 3. Esquema do mecanismo genômico e não genômico dos EAA. Na via genômica os andrógenos difundem-se através da membrana plasmática e interagem com receptores androgênicos (RA) no citoplasma. O complexo andrógeno-RA se desloca ao núcleo, onde se liga ao DNA, e essa interação recruta co-ativadores da expressão de genes específicos para regular a transcrição e síntese proteica. Na via não genômica os andrógenos interagem com os RA associados à membrana (MAR), levando à ativação de canais de cálcio tipo-L por intermédio da proteína G (GP). Este aumento de cálcio intracelular pode levar à ativação da proteína quinase C (PKC), e por meio de Calmodulina (CAM) pode ativar Proteína quinase A (PKA), vias de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), podem influenciar a transcrição de genes pela fosforilação. A interação com a proteína G pode ativar a Fosfolipase C (PLC), provocando um aumento de Inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), que promove à liberação de depósitos intracelulares de cálcio do retículo sarcoplasmático (RS). Figura do acervo do LHE, elaborada por Andrews Marques do Nascimento, 2017.

No mecanismo não genômico, os hormônios ligam-se a receptores

androgênicos de membrana (mRA) que estão ligados a proteína G. A origem destes receptores é controversa, porém, acredita-se que sejam os RA tradicionais que se associaram à membrana celular (Levin, 2011). A ativação dos receptores resulta na estimulação da produção de segundos mensageiros como o monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), responsável pela ativação da proteína quinase A (PKA), que por sua vez, estimula outros receptores de androgênicos citosólicos causando aumento do cálcio intracelular (Cato, Nestl e Mink, 2002; Schwartz et al., 2016).

No entanto, essa classificação dicotômica é imprecisa e não reflete a complexidade dos diferentes mecanismos nos quais os esteróides modulam a função celular. Além da ativação das cinases, das fosfatases, das fosfolipases e da sinalização dependente do cálcio, as cascatas rápidas associadas à membrana podem levar a efeitos genômicos a jusante, por meio da fosforilação e modulação dos fatores de transcrição e dos corretores. Além disso, o impacto total dos hormônios esteróides é o resultado da convergência das vias genômicas e não-genômica, sendo seus efeitos integrativos e, às vezes sinérgicos, que conferem a variabilidade e complexidade da função e aplicabilidade dos hormônios esteróides (Schwartz et al., 2016).

Os EAA apresentam diversas aplicações clínicas, sendo utilizados no tratamento de hipogonadismo em homens, situações de deficiência androgênica causada pelo envelhecimento em homens idosos ou doenças crônicas, suprimindo assim a deficiência de Testosterona (Cunha et al, 2005). Já foram utilizados em situações de comprometimento ósseo, como na osteoporose e situações de dor óssea, onde os EAA aumentam a deposição óssea ao estimularem os osteoblastos, (Gordon et al., 1999; Lise et al., 1999), porém, em desuso atualmente. Algumas situações clínicas onde o paciente apresenta comprometimento na massa corporal,

como na imunodeficiência adquirida, politraumatismos, queimaduras e períodos pós-operatórios, a utilização dos hormônios é benéfica, por aumentar a síntese proteica e reestabelecer a massa corporal (Wilson, 1988; Creutzberg e Schols, 1999; Rabkin et al., 2000). Inicialmente, os efeitos dos EAA sobre o desenvolvimento e restabelecimento da força muscular em indivíduos jovens ou idosos foram vistos com pouco interesse (Samuels et al., 1942; Simonson et al., 1974). No entanto, o benefício em relação ao ganho de massa muscular, tem estimulado o uso no meio esportivo, principalmente halterofilistas e fisiculturistas, como forma de melhorar o desempenho físico e atlético, bem como a aparência física (Tanner, Mille e Alongi, 1995; Kuhn, 2002).

As indicações clínicas dos EAA são ignoradas ou desconhecidas por usuários, que utilizam de forma abusiva e indiscriminada (Fрати et al., 2015). Além do mais, a utilização de EAA não se restringe apenas a atletas amadores ou profissionais (Hartgens e Kuipers, 2004; Angoorani e Halabchi, 2015), homens (Darke, Torok e Duflou, 2014) e mulheres (Malarkey et al., 1991; Onakomaiya e Henderson, 2016) adultos, cada dia mais jovens são os usuários, muitas vezes ainda em processo de formação ou desenvolvimento (Miller et al., 2005).

Levantamento realizado nos Estados Unidos verificou que, aproximadamente, 4 a 6% dos estudantes universitários do sexo masculino e 1 a 2% do sexo feminino utilizam EAA (Bahrke e Yesalis, 2004), com aumento significativo principalmente em frequentadores de academias que iniciaram o uso com mais ou menos 15 anos de idade (Evans, 2004). Em 2010, monitoramento com 15.100 adolescentes realizado pelo Instituto Nacional de Saúde nos EUA encontrou prevalência de 2,5% no uso de EAA para o sexo masculino (Terry-McElrath et al., 2013). Em países da Europa essa prevalência variou entre 2 a 4%, por adolescentes de 16 anos que utilizaram EAA

alguma vez na vida (Kokkevi et al., 2008). Estudo realizado pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), sobre a utilização de EAA no Brasil, evidenciou que 1,4% dos estudantes do ensino fundamental e médio das escolas públicas e privadas utilizaram estes hormônios ao menos uma vez na vida, e que em relação a estudo anterior ocorreu um aumento de 40% na utilização.

A utilização em doses supra fisiológicas dos EAA, em doses de 10 a 100 vezes maiores que a recomendada clinicamente, pode desencadear diversos efeitos colaterais, muitas vezes graves e irreversíveis, principalmente por ser dose e tempo dependentes, (Wu, 1997; Calfee e Fadale, 2006; Frati et al., 2015). Dentre os principais efeitos conhecidos em humanos pela utilização de EAA, destacam-se em homens a infertilidade e impotência, atrofia testicular, ginecomastia e tumor na próstata (Sondergaard, Thune e Gustafsson, 2014). Em mulheres, ocorre mudança nos padrões sexuais caracterizados por masculinização, aumento do clitóris, engrossamento vocal e irregularidade menstrual (Wu, 1997; Olivares et al., 2014). Além destes já citados, outros efeitos são evidenciados, independentemente do sexo do usuário, como tumores no fígado (Stimac et al., 2002), calvície, fechamento das epífises, (Yesalis et al., 1993), alteração nos níveis lipídicos (Kuipers et al., 1991), alteração de humor (Gruber e Pope, 2000) e complicações cardiovasculares (Kuipers et al., 1991; Wu, 1997; Fineschi et al., 2001).

1.2.2 Influência dos EAA no sistema cardiovascular

O sistema cardiovascular, em especial o coração sofre muita influência da utilização de EAA, como esperado, uma vez que RA estão presentes no coração (Mash et al., 1998). Estudos investigando a ligação da testosterona a receptores intracelulares forneceu a primeira evidência da presença de RA nos ventrículos (McGill et al., 1980; Lin, McGill e Shain, 1981). Outros estudos demonstraram que o

mRA está presente em cardiomiócitos isolados a partir de homens e mulheres, assim como em cardiomiócitos de ratos (Marsh et al., 1998). A presença dos RA no coração tem gerado interesse científico em entender o papel destes hormônios na função miocárdica. Além disso, são relatados na literatura diversos efeitos deletérios do uso abusivo de EAA sobre o sistema cardiovascular, como alterações na eletrofisiologia cardíaca promovendo arritmias (Sullivan, Martinez e Gallagher, 1999; Medei et al., 2010), hipertrofia cardíaca (Andrade et al., 2008; Hassan, Salem e Sayed, 2009; Franquni et al., 2013; Neves et al., 2013), cardiomiopatia dilatada, infarto agudo do miocárdio e até morte súbita (Fineschi et al., 2007).

O remodelamento cardíaco (RC), caracterizado pela deposição de colágeno e hipertrofia, é uma das alterações características da utilização de hormônios esteroides (Fanton et al., 2009; Franquni et al., 2013), sendo uma alteração na expressão gênica em resposta a uma agressão ou estímulo externo, que gera alterações estruturais no miocárdio, com alterações morfológicas e funcionais do coração (Cohn, Ferrari e Sharpe, 2000). Considerado um mecanismo de adaptação a sobrecarga hemodinâmica, para que o coração possa manter seu funcionamento adequado frente ao aumento pressórico, porém, dependendo das características deste remodelamento, pode ser considerado um fator de risco para complicações cardíacas (Olivetti et al., 2000; Kaplan, 2001).

O remodelamento pode ser uma condição fisiológica ou patológica, dependendo do estímulo sobre a célula alvo, como acontece nos cardiomiócitos, que estão particularmente envolvidos no processo de remodelamento do coração (Cohn, Ferrari e Sharpe, 2000). O aumento da carga hemodinâmica causada pelo exercício faz com que o coração sofra resposta hipertrófica, tendo como atributo sua expansão pela síntese de novas proteínas contráteis e pela montagem de novos

sarcômeros (Wakatsuki, Schlessinger e Elson, 2004). Isso aumentará o tamanho e a força contrátil dos cardiomiócitos de forma homogênea, sendo considerada uma forma de remodelamento fisiológica (Weber, 2000b). Em situações em que o coração está sujeito a condições de sobrecarga crônica, como no infarto do miocárdio, uma forma não homogênea de remodelamento ocorre, com presença desproporcional de colágeno, sendo considerado patológico (Fuster et al., 2001; Muhl, Dassen e Kuipers, 2008).

O colágeno cardíaco é sintetizado principalmente pelos fibroblastos, e sua produção pode provocar fibrose, que causa aumento da rigidez do miocárdio, interferindo no preenchimento sanguíneo do coração (Volders et al., 1993; Matsubara et al., 2000; Janicki e Brower, 2002). Os tipos de colágenos predominantes no coração são os fibrilares, tipo I e III (Matsubara et al., 2000; Janicki e Brower, 2002). Tipos de colágeno diferem estruturalmente, principalmente em relação ao diâmetro das fibras, no alinhamento e no grau de entrelaçamento (Montes, 1996). O colágeno tipo I apresenta fibras maiores com fibrilas mais grossas, conferindo mais resistência à tração, já no colágeno tipo III a resistência é menor devido às fibras apresentarem menor diâmetro com fibrilas mais finas (Montes, 1996; Ricard-Blum, 2011).

Fisiologicamente, o ventrículo esquerdo de um adulto normal possui aproximadamente 2% de colágeno (Weber, 1989), aumento nesta concentração pode alterar as propriedades mecânicas do coração (Shirwany e Weber, 2006). A fibrose intersticial no miocárdio ocorre pela deposição exacerbada de colágeno tipo I e III, com predominância do tipo I que contribui para rigidez do miocárdio (Weber, 1988; Jalil et al., 1989; Brilla, 1991), além de induzir à disfunção diastólica do ventrículo esquerdo, bem como a heterogeneidade elétrica do miocárdio, o que

predispõe a arritmias ventriculares (Mclenachan e Dargie, 1990). Estudos revelam que este tipo de fibrose pode ocorrer por falha nos mecanismos controladores do metabolismo de colágeno, como aumento de fatores pró-fibróticos como o fator de crescimento transformador β (TGF- β) e diminuição dos níveis de atividade de enzimas de degradação do colágeno (Weber, 2000b). O aumento da rigidez do miocárdio e a diminuição da contratilidade são consequências do remodelamento patológico, como na hipertrofia cardíaca hipertensiva que é um forte preditor de insuficiência cardíaca (Lips et al., 2003).

Classicamente, a hipertrofia cardíaca pode ser classificada em (Figura 4): (1) excêntrica (considerada fisiológica), tem como característica a adição de sarcômeros em série e crescimento longitudinal, com aumento do comprimento celular (Dorn, Robbins e Sugden, 2003). (2) concêntrica (podendo ser fisiológica ou patológica), identificada pela adição de sarcômeros em paralelo e crescimento lateral dos cardiomiócitos, com pouca ou nenhuma modificação no comprimento celular (Rakusan, 1998; Dorn, Robbins e Sugden, 2003). Estão associadas à hipertrofia concêntrica modificações nas proporções dos componentes intersticiais do miocárdio, como acúmulo de colágeno (Rothermel et al., 2000; Bueno et al., 2002). Nem sempre a hipertrofia cardíaca concêntrica é patológica, em determinadas situações como no exercício físico resistido, que ocorre sobrecarga hemodinâmica, esta hipertrofia não resulta em prejuízo funcional do miocárdio (Tanno et al., 2011).

As alterações moleculares hipertróficas do coração são similares as observadas durante o desenvolvimento embrionário, portanto, acredita-se que ocorra reindução do programa genético fetal na hipertrofia cardíaca (Frey et al., 2004). A reexpressão de alguns genes característicos da vida fetal, podem ser considerados marcadores de hipertrofia cardíaca patológica, como o do ANP em células

ventriculares, (Silva et al., 2006), da α -actina esquelética no miocárdio (Driesen et al., 2009) e da β -miosina de cadeia pesada (β -MCP) no ventrículo (Oliveira e Krieger, 2002).

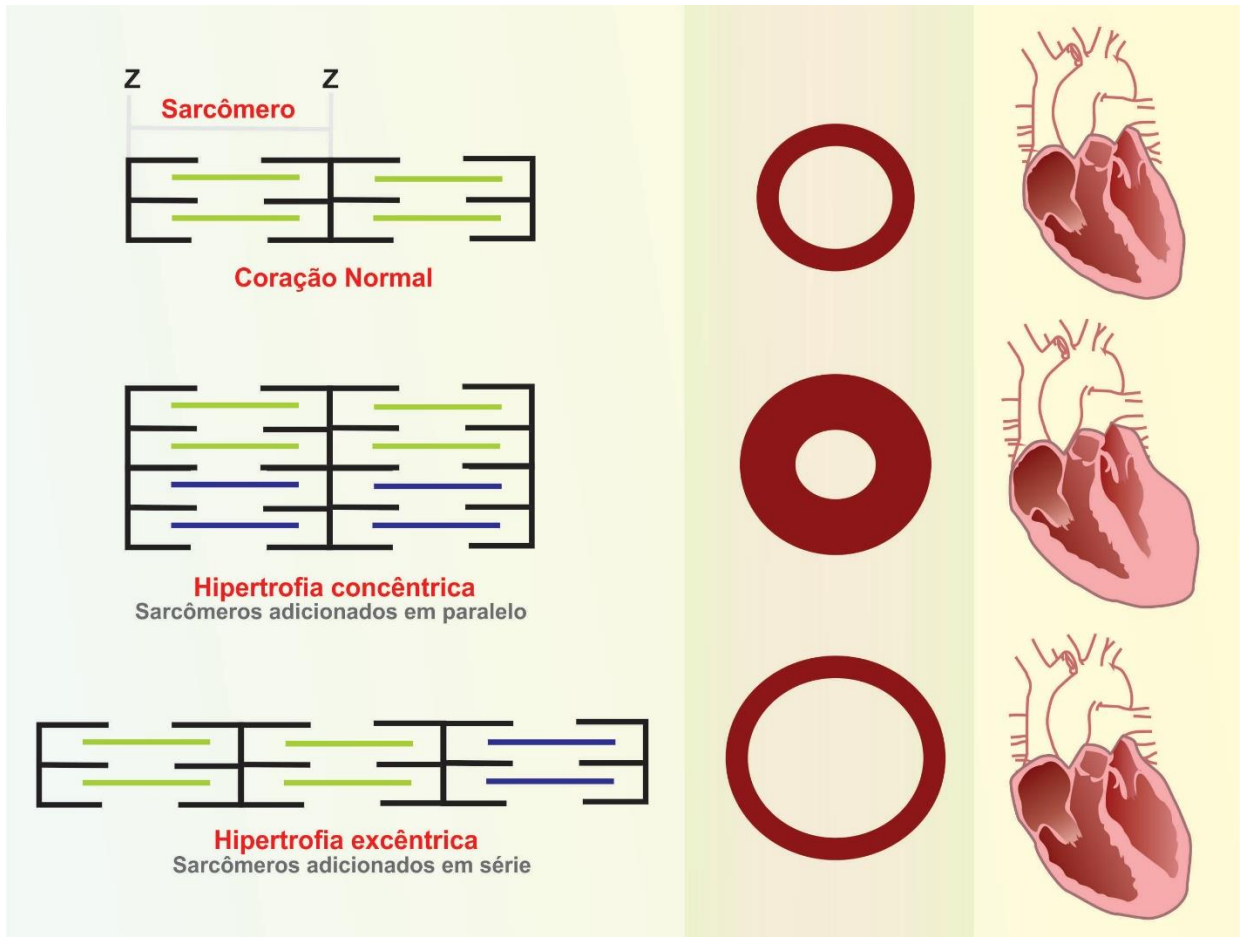


Figura 4. Esquema representativo da diferenciação dos tipos de hipertrofia cardíaca concêntrica e excêntrica. Na hipertrofia concêntrica, os sarcômeros são adicionados em paralelo, enquanto na hipertrofia excêntrica ocorre adição de sarcômeros em série. Sarcômeros: espaço compreendido entre dois discos Z. Adaptado de Garcia e Incerpi, 2008.

Os agentes estimuladores do RC podem ser fatores mecânicos e bioquímicos, capazes de agir em receptores, canais iônicos e nas integrinas presentes na membrana sarcolemal que, ativando sinalizadores bioquímicos citosólicos, desencadeiam aumento da síntese de proteínas e alterações na

expressão gênica (Okoshi et al., 2004). Diversos modelos experimentais reportam o RC patológico causado pela utilização de DN, com variações em doses e tempo de uso, promovendo hipertrofia cardíaca concêntrica associada ao aumento da proporção de colágeno e alteração na funcionalidade do coração (Tanno et al., 2011; Andrade et al., 2011; Franquni et al., 2013), Brasil et al. (2015) evidenciaram que tratamento com DN (20mg/Kg/semana) durante quatro semanas induziu remodelamento cardíaco patológico, confirmado pelo aumento de colágeno cardíaco. Franquni et al. (2013) evidenciaram que além do remodelamento cardíaco, os ratos machos tratados com DN (20mg/Kg/semana) desenvolveram hipertensão em quatro semanas de tratamento. Tanno et al. (2011) observaram que ratos tratados com DN apresentaram hipertrofia cardíaca concêntrica associada à alteração sistólica e diastólica, além disso genes integrantes do período fetal, como α -actina e β -MCP, estavam reexpressos no ventrículo esquerdo destes animais.

1.2.3 Função cardíaca

A função básica do coração é garantir a perfusão sanguínea dos tecidos periféricos e o aporte sanguíneo para os alvéolos de modo a permitir a troca gasosa. O funcionamento do ventrículo esquerdo inclui diversas etapas e eventos, já bem descritos na literatura, que resumidamente podem ser divididos em duas fases magnas do ciclo cardíaco, as fases de contração e relaxamento, chamados de sístole e diástole, respectivamente (Little, 2001) (Figura 5). O Ca^{2+} está diretamente envolvido com o processo de contração e relaxamento cardíaco, sendo um fator indispensável (Bers, 2002). A unidade básica de contração dos miócitos cardíacos é o sarcômero, unidade individual delimitada em suas extremidades pelo sistema tubular-T. (Bers, 2001; Soeller e Cannel, 2003). Os túbulos-T são invaginações cilíndricas do sarcolema (membrana das células musculares) que se estendem

profundamente para o interior da célula e abeira-se ao retículo sarcoplasmático (RS) (Brette e Orchard, 2003).

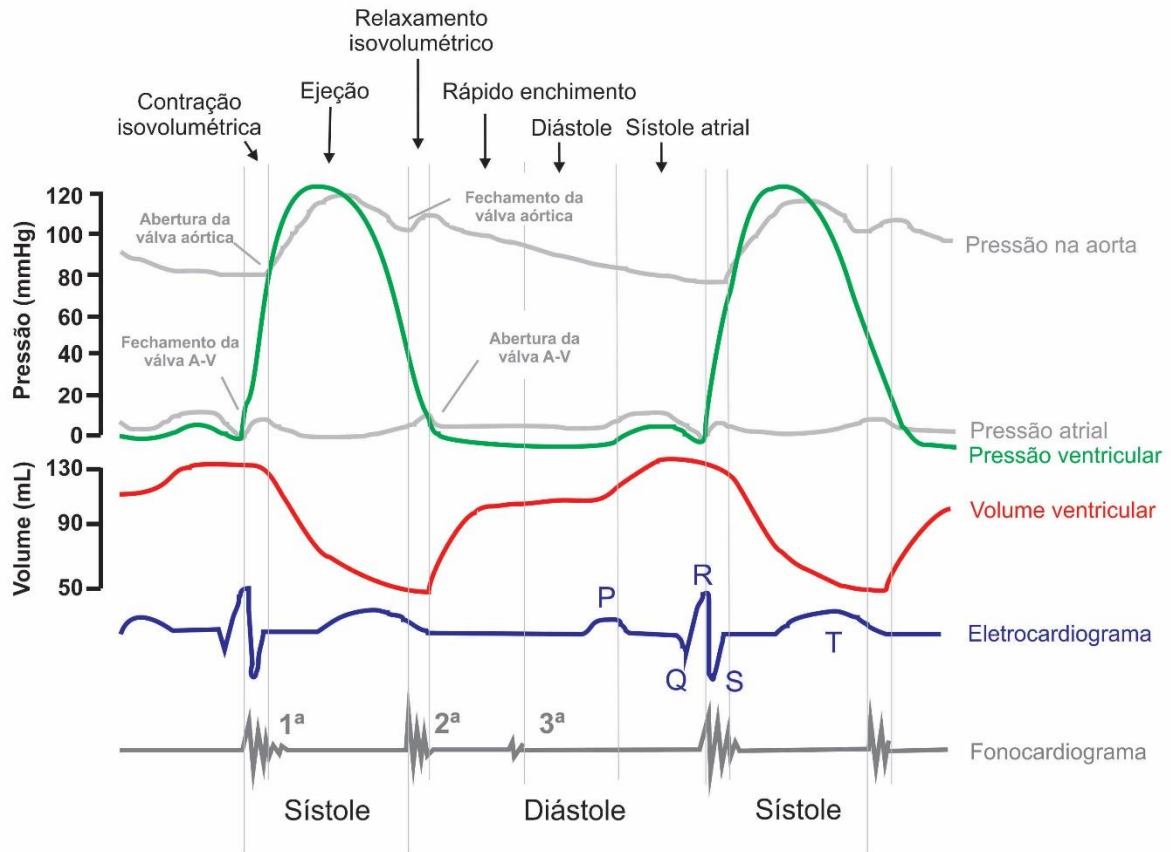


Figura 5. Diagrama de Wiggers, mostrando os eventos do ciclo cardíaco que ocorrem no ventrículo esquerdo. Adaptado de Mitchell e Wang, 2014.

O RS é uma organela luminal localizada ao longo do interior da célula miocitária, e está envolvida na captação, sequestro e liberação de Ca^{2+} , sendo dividido em dois componentes principais conhecidos como RS juncional (RSJ) e RS rede (RSR). O RSJ é a porção do RS mais próxima dos túbulos-T e possui em sua membrana receptores de rianodina tipo-2 (RyR2), que interagem com os canais de Ca^{2+} tipo-L presentes nas células dos túbulos-T (Hayashi et al., 2009; Baddeley et al., 2009).

Durante a fase inicial de despolarização do potencial de ação ocorre abertura dos canais de Ca^{2+} tipo-L, permitindo a entrada de Ca^{2+} e ligação com os RyR2, que

por sua vez libera Ca^{2+} no citosol num processo dependente de Ca^{2+} (Fabiato, 1985; Bers e Stiffel, 1993). A contração muscular ocorre após ligação do Ca^{2+} a troponina C (TnC), localizada na tropomiosina nos filamentos de actina. Após ligação com Ca^{2+} a TnC estabiliza sua ligação com Troponina I (TnI) mudando a conformação da Tropomiosina, responsável pelo bloqueio do sítio de ligação da miosina. Com isso, ocorre a formação de pontes cruzadas de actina-miosina fracamente ligadas, culminando na contração muscular (Seidman e Seidman, 2001; Dobesh, Konhilas e Tombe, 2002).

Para que ocorra a diástole, a quantidade de Ca^{2+} no citosol anteriormente aumentada para o processo de contração deve ser retirada. Existem dois principais mecanismos envolvidos neste processo, o primeiro mecanismo está relacionado com a retirada do Ca^{2+} do meio intracelular para o meio extracelular, e o segundo mecanismo é a recaptação do Ca^{2+} para o RS (Bassani, Bassani e Bers, 1994). O trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) é uma proteína transportadora de íons presente na membrana plasmática de células de animais adultos, altamente expressa em cardiomiócitos, e é responsável pela extrusão do Ca^{2+} intracelular. Em potenciais de membrana mais hiperpolarizados, o NCX retira um íon Ca^{2+} enquanto importa íons de Na^+ (Dipolo e Beaugé, 2006). Em função da troca de íons $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, exercida pelo NCX, nas células miocárdicas em repouso, uma corrente despolarizante é gerada, ocorrendo inversão de função do NCX. O fluxo invertido destes íons coopera para a elevação de Ca^{2+} intracelular na fase inicial do platô e contribui para o aumento da contratilidade cardíaca, devido ao acúmulo de Ca^{2+} nos cardiomiócitos (Dipolo e Beaugé, 2006). Esta inversão ocorre, pois, a movimentação do trocador depende do gradiente eletroquímico do Na^+ , que quando aumentado no meio intracelular pode induzir uma elevação intracelular de Ca^{2+} . De modo inverso, a

redução intracelular de Na^+ beneficia o efluxo de Ca^{2+} , via NCX, diminuindo a contratilidade miocárdica (Katz, 1992). Outro componente importante na extrusão de Ca^{2+} é a ATPase de Ca^{2+} do sarcolema, porém o fluxo por meio desta via é pequeno (2-3%) em relação a outras vias (Bassani, Bassani e Bers, 1992).

O principal mecanismo de recaptção de Ca^{2+} no RS é a SERCA, presente preferencialmente no RSR (Bers, 2001; Hayashi et al., 2009). Estruturalmente, a proteína SERCA é uma proteína transmembranar com 110 kDa de massa molecular, dividida em 3 regiões distintas, incluindo a cabeça citoplasmática, hélices transmembranares (contendo dois sítios de ligação de Ca^{2+}) e as alças luminais (Periasamy e Kalyanasundaram 2007). A cabeça citoplasmática do SERCA, que está presente em todas as isoformas da SERCA, é composta pelo domínio ativador, domínio de fosforilação e domínio nucleotídico, cada um dos quais tem um papel único na determinação da função da bomba SERCA (Figura 6). O domínio ativador proporciona o agente principal para a translocação de Ca^{2+} , enquanto que a hidrólise de ATP ocorre na interface entre o domínio de nucleotídeo e o domínio de fosforilação (Toyoshima e Inesi 2004). SERCA é codificada por uma família de três genes, SERCA1, 2 e 3, que codificam diversas isoformas. Foram identificadas mais de 10 diferentes isoformas da SERCA e estas isoformas contribuem em propriedades fisiológicas específicas no tecido na qual são expressas (Periasamy e Kalyanasundaram, 2007). A isoforma SERCA-2a é a principal isoforma cardíaca e é também responsável pela contração lenta no músculo esquelético (Wu et al., 1995), presente em ambos estágios de desenvolvimento cardíaco, adulto e neonatal em ratos (Lompré et al., 2006). Modelos experimentais utilizando manipulação genética da expressão SERCA-2a evidenciaram alterações na função contrátil cardíaca (Hajjar et al., 1998; Periasamy et al., 1999).

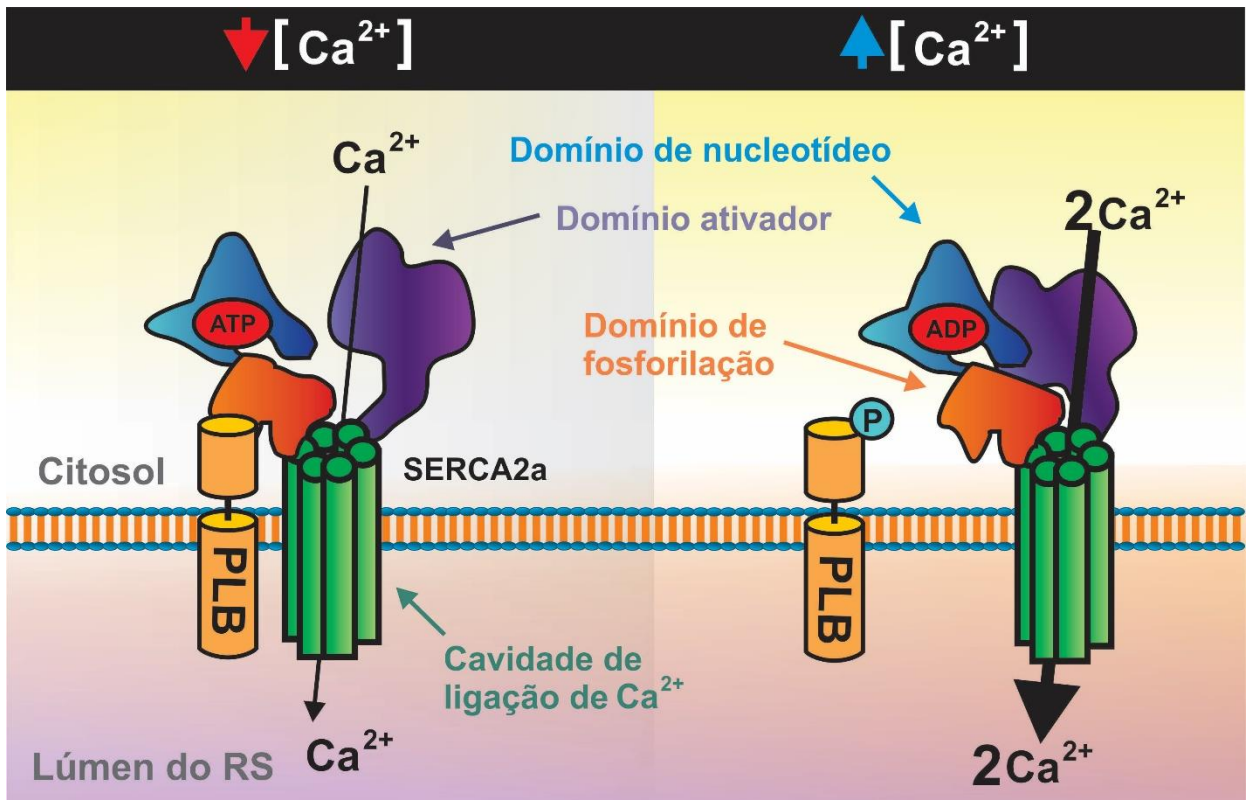


Figura 6. Estrutura da bomba do retículo sarcoplasmático ATPase 2 (SERCA-2a) em diferentes concentrações de cálcio (Ca^{2+}) citosólico. Em concentrações baixas de Ca^{2+} citosólico a SERCA-2a apresenta-se com atividade reduzida, devido a ligação com a fosfolambam (PLB). Concentrações elevadas de Ca^{2+} promovem a fosforilação da PLB, que resulta em maior atividade da SERCA-2a, tendo como efeito a receptação aumentada de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático (RS). Figura do acervo do LHE, elaborada por Andrews Marques do Nascimento, 2017.

A atividade aumentada da SERCA-2a no coração aumenta a capacidade de contração e relaxamento cardíaco, enquanto a diminuição de sua atividade prejudica estes parâmetros e pode resultar em cardiomiopatia dilatada e insuficiência cardíaca (Haghighi et al., 2001). O bombeamento de Ca^{2+} pela SERCA-2a é influenciado por proteínas como a fosfolambam (PLB) ou a sarcolipina (SLN), homólogas e membros da mesma família de genes (Odermatt et al., 1997).

A PLB é uma proteína transmembrana de 52 aminoácidos que inibe as moléculas de SERCA-2a por diminuir a sua afinidade por Ca^{2+} , por exemplo, em

situações que a concentração citosólica de Ca^{2+} está baixa (Periasamy et al., 2008). As interações inibitórias da PLB sobre a SERCA, são interrompidas pela fosforilação de PLB, que dissocia a PLB da SERCA-2a, como acontece em concentrações elevadas de Ca^{2+} (Bers, 2001). Situações em que o Ca^{2+} encontra-se elevado ocorre ativação da Ca^{2+} -calmodulina quinase tipo 2 (CaMKII), uma proteína quinase específica para serina/treonina que fosforila PLB no resíduo treonina-17 (Bhupathy et al., 2007). Outro mecanismo de regulação PLB ocorre em resposta à estimulação e ativação adrenérgica da proteína quinase A (PKA) (Tsien, 1977; Levitzki, 1988). Mais especificamente, o PLB é fosforilado por PKA no resíduo de serina 16 para aliviar a inibição de SERCA-2a, e assim, aumentar as taxas de contração e relaxamento no músculo cardíaco (Koss et al., 1995; MacLennan e Kranias, 2003). A fosforilação de PLB na serina-16 pela PKA ou treonina-17 por CAMKII aumentam a atividade de SERCA-2a em 2 a 3 vezes, acelerando o processo de relaxamento e contribuindo para os efeitos relaxantes da alta concentração de Ca^{2+} intramuscular e estimulação adrenérgica (Koss et al., 1995; MacLennan e Kranias 2003). Para encerrar a fase de contração do ciclo cardíaco, ocorre dissociação do Ca^{2+} das proteínas contráteis e captação deste íon pelo RSR, restaurando os valores de Ca^{2+} a níveis diastólicos (Figura 7) (Winslow et al., 2016). Em situações de insuficiência cardíaca ou hipertrofia cardíaca patológica a expressão da SERCA-2a é reduzida e a troca de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ pelo NCX é aumentada (Hasenfuss, 1998), de modo que esses sistemas contribuem mais igualmente para o declínio da concentração de Ca^{2+} citosólico (Bers, 2001; Pogwizd et al., 2001). Esta redução no teor de Ca^{2+} no RS, limita sua liberação no ciclo cardíaco posterior, e esta pode ser uma causa central do déficit contrátil sistólico (Bers, 2001). A hipertrofia patológica pode aumentar a duração do tempo de relaxamento do ventrículo esquerdo e provocar alterações no

metabolismo do cálcio, além de promover alterações na expressão gênica de proteínas contráteis como a SERCA-2a (Nadal-Ginard e Mahdavi, 1989; Parker e Schneider, 1991).

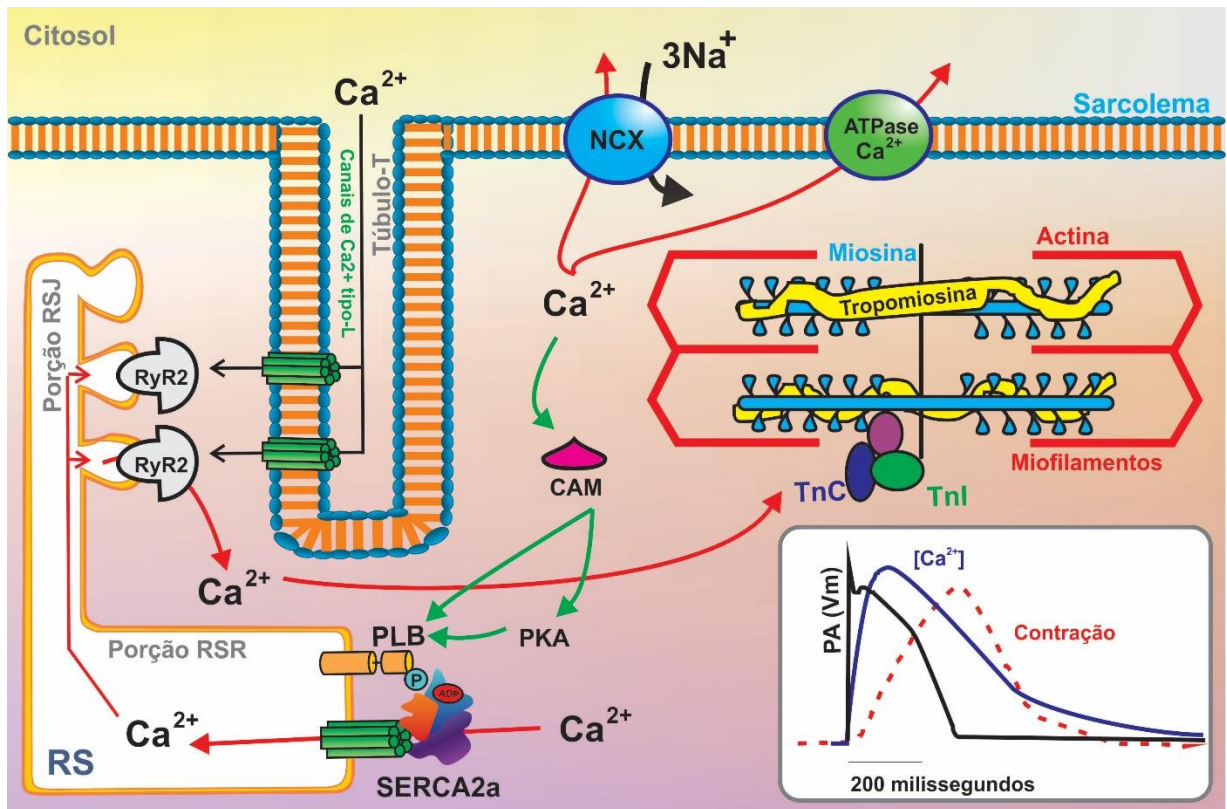


Figura 7. Transporte de Ca^{2+} em miócitos ventriculares. Base molecular e estrutural relacionada com o mecanismo básico excitação e contração cardíaca. Trocador bomba do retículo sarcoplasmático ATPase 2 (SERCA-2a); Fosfolambam (PLB); Retículo Sarcoplasmático (RS); Trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX); Receptores de Rianodina tipo-2 (RyR2); porção do RS Juncional (RSJ); porção do RS Rede (RSR); Potencial de Ação (PA); Troponina C (TnC); Troponina I (TnI); Proteína Quinase A (PKA); calmodulina (CAM). Figura do acervo do LHE, elaborada por Andrews Marques do Nascimento, 2017.

Portanto, mecanismos que aumentam o conteúdo total de PLB ou a sua fosforilação são essenciais na regulação da atividade de SERCA-2a no coração, e alterações em longo prazo nas interações entre PLB e SERCA-2a poderiam explicar algumas das anormalidades no Ca^{2+} em complicações cardíacas (Hajjar et al., 1998;

Minamisawa et al., 1999). Estudos revelam a influência dos EAA, por meio do mecanismo não genômico e genômicos, promovendo alterações no Ca^{2+} intracelular em cardiomiócitos, culminando em hipertrofia destas células. Evidências sugerem que o uso crônico de EAA geram uma resposta genômica que leva ao aumento da expressão dos canais de Ca^{2+} do tipo-L (Er et al., 2009). Perspectivas adicionais sobre a implicação destes efeitos dos EAA sobre a expressão gênica e respostas genômicas em longo prazo são necessárias.

1.2.4 Exercício físico

O exercício físico de qualquer natureza promove efeitos benéficos para a saúde, pois retira o organismo da homeostase, proporcionando aumento na demanda energética da musculatura e do organismo em geral (Brum et al., 2004). A atividade física exercida com assiduidade é capaz de influenciar positivamente o sistema cardiovascular, sendo considerado uma ferramenta não farmacológica na prevenção e tratamento de complicações cardíacas (Mann e Rosenzweig, 2012; Rodrigues et al., 2014). Na Década de 70, McElroy et al. (1978) já evidenciavam que a prática regular de exercício físico era capaz de promover cardioproteção. Na atualidade, sabe-se que várias alterações adaptativas promovidas pelo exercício físico são responsáveis pela cardioproteção, e estão relacionadas com a melhora da função cardíaca (Chaves et al., 2006; Ellison et al., 2012). Dentre elas tem destaque a hipertrofia cardíaca fisiológica (Ellison et al., 2012; Weiner e Baggish, 2012), indução de óxido nítrico sintase, aumento da atividade de enzimas antioxidantes (Pinho et al., 2010), redução da pressão arterial (Moraes et al., 2012a) e redução da área de infarto (Brown et al., 2003). A estrutura miocárdica é remodelada em função do tipo de treinamento físico, por meio de um aumento equilibrado da massa

miocárdica, que engloba hipertrofia miocitária e neoangiogênese (Shephard e Balady, 1999). A hipertrofia cardíaca induzida pelo exercício tem como característica o crescimento fisiológico do coração e está associada à estrutura cardíaca normal com função mantida ou melhorada, sem aumento na deposição de colágeno (Mihl, Dassen e Kuipers, 2008; Weeks e McMullen, 2011). No entanto, dependendo do protocolo de treinamento utilizado algumas complicações cardíacas podem estar associadas, como a arritmias cardíacas e morte súbita (Wight e Salem; Hart, 2003).

O exercício físico pode ser classificado como resistido (conhecido também por estático ou isométrico) ou de resistência (também denominado dinâmico ou isotônico). O exercício resistido é muito praticado por atletas de musculação, halterofilistas, onde a força é aplicada com pouco ou nenhum movimento. Já no exercício de resistência a atividade realizada é isotônica, como em corrida, natação e ciclismo, que promovem aumento do débito cardíaco devido ao aumento na frequência e volume sistólico (Revisado por Fernandes, Soci e Oliveira, 2011).

Dependendo do tipo de exercício físico praticado, resistido ou de resistência, as modificações adaptativas do coração podem divergir, pois existem variações da carga hemodinâmica exercida sobre o coração. Normalmente, o exercício está associado a hipertrofia cardíaca fisiológica concêntrica e excêntrica, caracterizada por um perfil uniforme de parede ventricular e crescimento do septo (Pluim et al., 2000; Dorn, 2007).

Em geral, os atletas praticantes de treinamentos de resistência apresentam aumento na espessura da parede ventricular esquerda e dilatação significativa do ventrículo esquerdo, característico da hipertrofia excêntrica. Por outro lado, atletas treinados em força desenvolvem hipertrofia concêntrica, exibindo espessamento das

paredes ventriculares esquerdas, com dilatação ventricular esquerda de leve à moderada. Os atletas que combinam os treinos de resistência com força, exibem maior grau de dilatação ventricular esquerda e com espessamento significativo da parede do ventrículo (Revisado por Fernandes, Soci e Oliveira, 2011).

Atletas que utilizam EAA buscando melhorar o desempenho físico ou estética corporal, geralmente associam o consumo destas substâncias ao treinamento de força ou ao exercício físico anaeróbio (Grogan et al., 2006). Em geral esta associação se mostra prejudicial para o organismo, principalmente quando o exercício praticado é resistido (Cunha et al., 2005; Tanno et al., 2011). Vale ressaltar que no presente estudo o protocolo de treinamento físico utilizado foi de alta intensidade (resistido), capaz de mimetizar em animais situações que ocorrem em humanos nas academias, que muitas vezes praticam exercícios sem respeitar seus limites e associam ao uso de doses supra fisiológicas de EAA. Stolt et al. (1999) descreveram que usuários de altas doses de EAA, que associaram a prática de exercícios físicos resistidos, desenvolveram hipertrofia ventricular esquerda patológica, associada a aumento do intervalo QT, normalmente relacionada com arritmias com possível evolução para morte súbita. Tanno et al. (2011) evidenciaram que a associação de DN com exercício de força foi capaz de hipertrofiar o coração, causando ainda, deposição de colágeno e transcrição de genes fetais marcadores de dano cardíaco. Foram relatadas elevações na pressão sistólica e diastólica como resultado da administração de altas doses de EAA (Riebe et al., 1992; Grace et al., 2003). Lima et al. (2015) além da hipertrofia cardíaca com deposição de colágeno, relatou desenvolvimento de hipertensão e desbalanço em citocinas relacionadas com a inflamação. Diversos outros estudos relatam efeitos cardiovasculares negativos desta associação, como apoptose no

tecido cardíaco, prejuízo na angiogênese, aumento de caspase-3 (Hassan e Kamal, 2013) e morte súbita (Fрати et al., 2015).

Como descrito anteriormente, é bem relatado na literatura que o exercício físico quando realizados com frequência se mostra benéfico para o sistema cardiovascular, no entanto, em relação ao exercício resistido, modelo empregado no presente estudo, pouco se sabe sobre as respostas cardiovasculares desencadeadas (Barauna et al., 2005), sobretudo no que se refere à associação com o uso de doses abusivas de EAA. Existe uma clara preocupação com o uso de EAA tanto por homens quanto por mulheres (Braunstein, 2007; Sirianni et al., 2012), porém não houve estudos avaliando a influência dessas substâncias sobre a contratilidade cardíaca em fêmeas. Portanto, a hipótese deste estudo é que a utilização do DN pode interferir na função cardíaca por alterar a regulação citosólica de Ca^{2+} . Adicionalmente, visto que existem efeitos cardioprotetores do exercício, é possível que a associação com DN interfira nos efeitos do exercício.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar a contratilidade do ventrículo esquerdo em ratas jovens, após tratamento crônico e em alta dose de Decanoato de nandrolona, submetidas ou não a atividade física resistida.

2.2 Objetivos específicos:

Avaliar o efeito do tratamento com Decanoato de nandrolona e/ou exercício físico resistido na:

- ✓ Pressão e a frequência cardíaca;
- ✓ Pressões intraventriculares e derivadas de pressão;
- ✓ Hipertrofia cardíaca;
- ✓ Área de deposição de colágenos no coração (fibrose cardíaca);
- ✓ As expressões proteicas da SERCA-2a, da PLB, da p-PLB e do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

3 MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Para realização deste estudo, foram utilizadas ratas *Wistar* (*Rattus norvegicus*), pesando inicialmente entre 180-200g e com idade aproximada de dois meses. Os animais foram cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), mantidos em gaiolas individuais de polipropileno, com umidade e temperatura (22°C) controlada, e ciclo claro-escuro de 12h. Os animais tiveram acesso à água e comida (Purina Labina, SP-Brazil) *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, descritos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA; BRASIL, 2013) e aprovados pela Comissão de Ética para uso de Animais da UFES (CEUA-UFES: 031/2012).

Os animais foram separados em 4 grupos experimentais, de acordo com o protocolo de tratamento ao qual foram submetidos (Figura 8):

- ✓ C (n=7), animais tratados com veículo, óleo de amendoim (intramuscular, I.M.) duas vezes por semana, e não submetidos a exercício físico;
- ✓ CE (n=7), animais tratados com o veículo, óleo de amendoim (intramuscular, I.M.) duas vezes por semana, e submetidos ao protocolo de exercício resistido (ER), 5 vezes por semana;
- ✓ ND (n=7), animais tratados com Decanoato de nandrolona (DN; Deca Durabolin[®], Organon, São Paulo) na dose de 20 mg/kg por semana (I.M.) divididos em duas aplicações por semana, não submetidos a exercício físico resistido;

- ✓ NDE (n=7), animais tratados com DN (Deca Durabolin[®], Organon, São Paulo) na dose de 20 mg/kg por semana (I.M.) divididos em duas aplicações por semana, e submetidos ao exercício físico resistido. Todos os protocolos de tratamento foram mantidos por 4 semanas. Os experimentos foram realizados em prazo máximo de 5 dias após a última dose de DN.

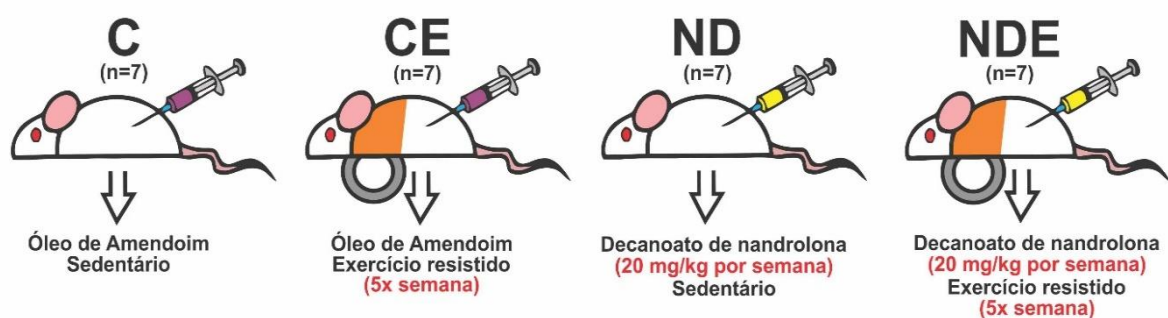


Figura 8 Representação da divisão dos grupos experimentais.

3.2 Exercício físico resistido

O protocolo de exercício físico resistido foi realizado de acordo com o descrito por Voltarelli, Gobarro e Mello (2002), com modificações (Figura 9). De maneira resumida, uma semana antes do início do protocolo experimental, os animais foram adaptados ao meio líquido, sendo mantidos em um recipiente cilíndrico com água aquecida ($31^{\circ} \text{C} \pm 1$), por 60 minutos sem, entretanto, serem submergidos. Após a adaptação, iniciou-se o protocolo de treinamento que consistia em seis sessões de saltos, com anilhas de chumbo acoplado ao tórax do animal, equivalente a 40% da massa corporal, onde esses eram incentivados a saltar em um recipiente com água pré-aquecida ($31^{\circ} \text{C} \pm 1$), contendo três vezes sua altura, por 30' seguidos de 30' de descanso. Após esse treino, os animais foram mantidos em descanso por nove minutos e retornaram ao exercício físico com carga reduzida (30% da massa corpórea), durante oito sessões de 60'

treinando, seguido de 30' de descanso, com contagem de saltos por minutos durante todas as sessões. Ao final do procedimento, foram retirados 20 μ L de sangue da ponta da calda dos animais para dosagem de lactato sanguíneo medido com o auxílio de um lactímetro. O exercício físico resistido foi realizado cinco vezes por semana durante quatro semanas (Cunha et al., 2005).

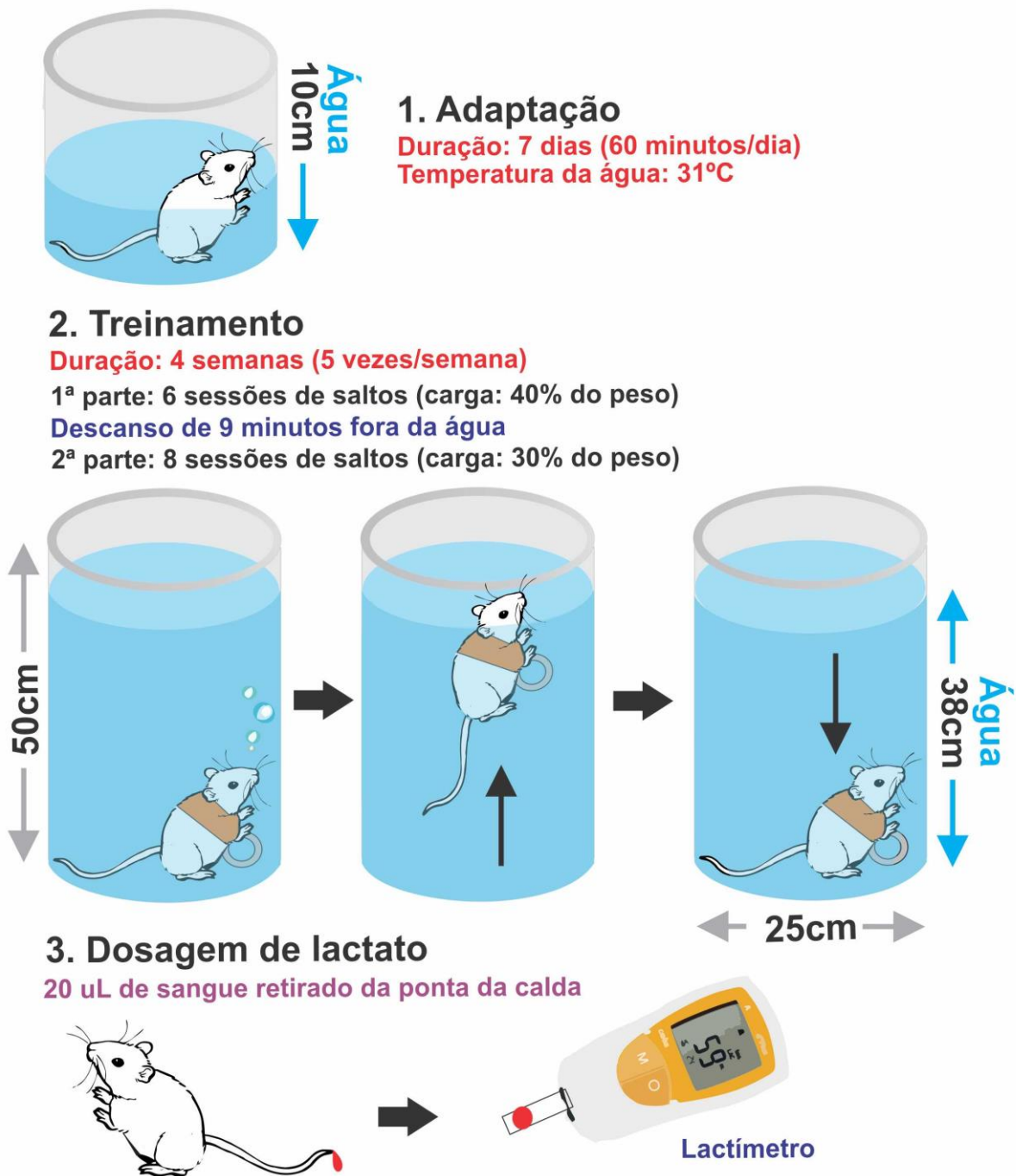


Figura 9: Representação do modelo experimental de exercício físico resistido. Figura do acervo do

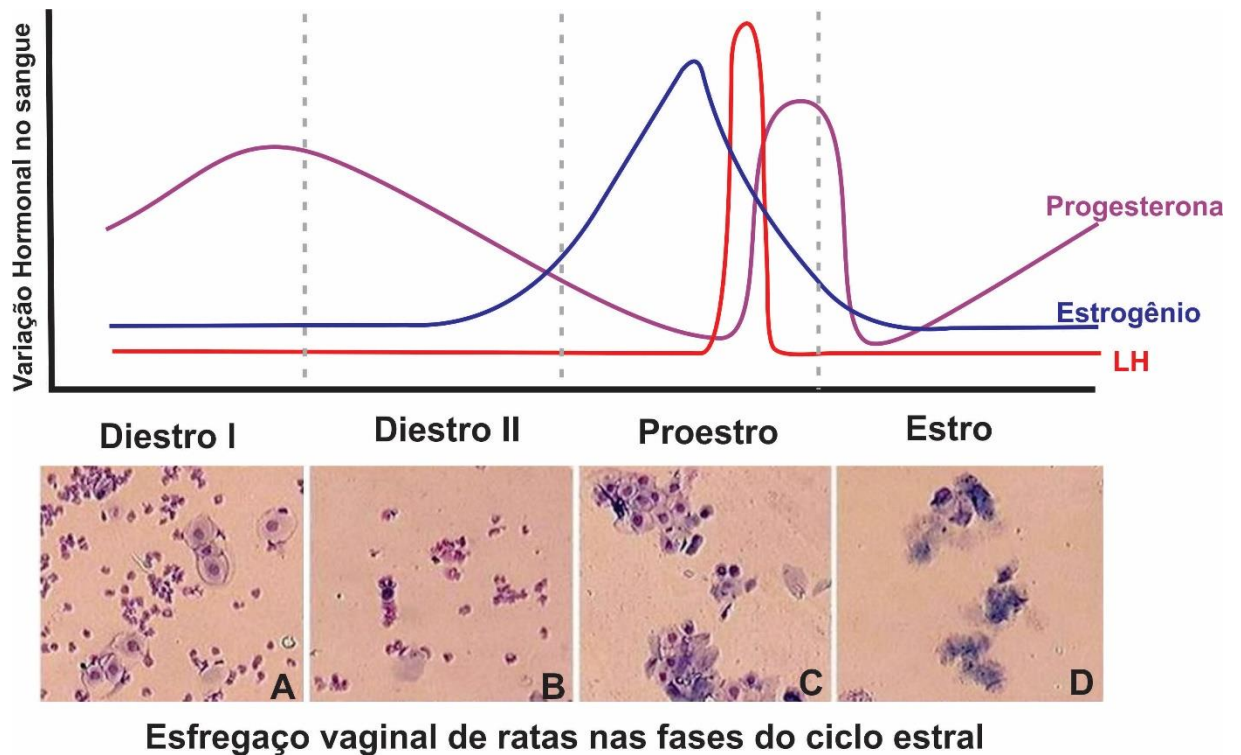
LHE, elaborada por Andrews Marques do Nascimento, 2017.

3.3 Avaliação do ciclo estral pelo esfregaço vaginal

Os animais foram submetidos à avaliação do ciclo estral, com o objetivo de verificar a ciclicidade normal e fase das ratas, uma semana antes da realização dos experimentos, que por sua vez, só foram realizados quando as ratas dos grupos C e CE estavam no proestro (Marcondes, Bianchi e Tanno, 2002).

Para este procedimento, 20 μ L de solução salina (NaCl 0,9%) foram inseridos na cavidade vaginal das ratas com o auxílio de uma micropipeta, o conteúdo vaginal foi coletado e aplicado a uma lâmina de vidro com 50 μ L de solução de lugol, e posteriormente, foi analisado em microscópio ótico binocular (Leica DM/LS, Leica – Germany) (Vilela, Santos Junior e Silva, 2007).

A determinação do ciclo foi realizada por meio da observação da presença e predominância de células nucleadas, escamosas e leucócitos, e classificadas em estro, diestro I, diestro II e proestro (Figura 10). Estro: queda da produção estrogênica e, na análise da citologia observa-se apenas células escamosas; Diestro I, também chamado de metaestro: quando se observa presença de células nucleadas, escamosas e leucócitos em igual quantidade; Diestro II: com presença de células nucleadas e leucócitos à observação microscópica; Proestro: auge da produção estrogênica, quando apenas células nucleadas são vistas na análise microscópica (Marcondes, Bianchi e Tanno, 2002).



Esfregaço vaginal de ratas nas fases do ciclo estral

Figura 10: Representação da variação hormonal durante o ciclo estral e esfregaço vaginal em microscópio ótico (aumento 40x) A- Metaestro ou Diestro I caracterizada por um pouco das 3 células. (Células Nucleadas, Epiteliais e Leucócitos). B- Diestro II- caracterizada por infiltrado leucocitário. C- Proestro – caracterizada por presença predominante de células nucleadas. D- Estro – caracterizada por presença predominante de células epiteliais. Figura do acervo do LHE, elaborada por Andrews Marques do Nascimento, 2017.

3.4 Avaliação da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC)

Para a avaliação da pressão arterial média e frequência cardíaca, foi realizada a cateterização da artéria e veia femorais. Previamente, os animais foram anestesiados com Quetamina e Xilasina (100/10 mg/kg; I.P.) e uma incisão na região inguinal foi realizada para o isolamento do plexo vâsculo-nervoso, possibilitando a cateterização da artéria e veia femoral, respectivamente, utilizando cateteres de polietileno (PE10 acoplado à PE50, Clay Adams, USA). Os cateteres foram mantidos preenchidos com solução salina (NaCl 0,9%) e ocluídas com pinos de aço inoxidável. O cateter arterial femoral esquerdo foi conectado a um transdutor de pressão (Grass Instrument Div., Warwick, NY, USA; Model PT 300) e

os valores de registro da pressão arterial média (PAM), e frequência cardíaca (FC) foram obtidos, após 24h do procedimento de cateterização, por meio de um sistema computadorizado e um programa para aquisição de dados biológicos (Biopac System[®]; MP100, Santa Barbara, CA, USA) (Franqui et al., 2013).

3.5 Avaliação da função ventricular esquerda

Após a mensuração da PAM e da FC, os animais foram anestesiados com Quetamina e Xilasina (100/10 mg/kg; I.P.). A função ventricular esquerda (VE) dos animais foi avaliada como previamente descrito por Wang et al., (2003). Resumidamente, a artéria carótida direita foi separada do tecido conjuntivo e cateterizada com um cateter de polietileno (PE50) preenchido com solução salina (NaCl 0,9%)(Figura 11). O cateter foi ligado a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados (modelo MP100-CE, Biopac Systems, Santa Bárbara, CA, EUA). Após 15 minutos de estabilização, foram registradas as pressões arteriais sistólica e diastólica. O cateter foi então introduzido no ventrículo esquerdo para aferição dos parâmetros funcionais do ventrículo esquerdo, sendo eles:

- ✓ Valores máximos da primeira derivada da pressão ventricular esquerda ($+dP/dt_{\text{máx}}$), que é a taxa máxima de aumento da pressão ventricular;
- ✓ Valores mínimos da primeira derivada da pressão ventricular esquerda ($-dP/dt_{\text{min}}$), que é a taxa de decaimento da pressão ventricular;
- ✓ Constante de tempo do relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo (τ).

Seguindo este procedimento, o cateter foi retirado do ventrículo esquerdo, e a

pressão arterial foi medida novamente para determinar se ocorreu dano à válvula aórtica. Os dados foram analisados utilizando o software LabChart, versão 7 (AD Instruments, Castle Hill, Austrália).

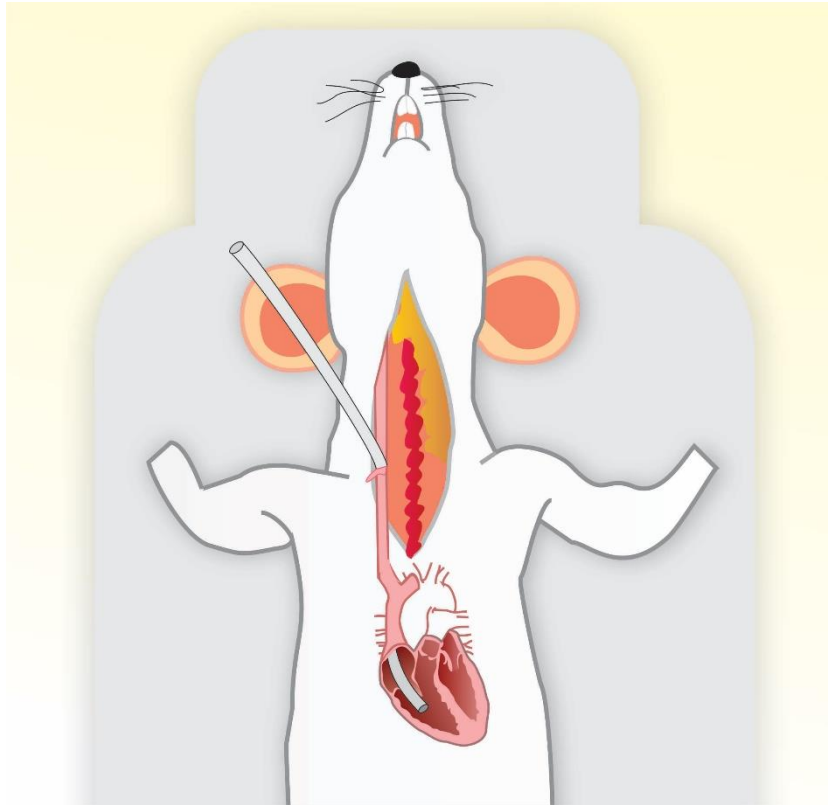


Figura 11: Representação esquemática da cirurgia de canulação do ventrículo esquerdo por meio da artéria carótida direita. Adaptado de Smith e cols., 1979).

3.6 Retirada dos tecidos e análises histológicas

Após a avaliação da contratilidade cardíaca no ventrículo esquerdo, os animais foram eutanasiados por decapitação, o sangue foi recolhido e a cavidade torácica exposta, onde foi possível exteriorizar o coração e posteriormente realizar a separação do átrio direito (AD) e dos ventrículos.

Os animais tiveram o coração lavado em solução salina, foram secos e pesados. Os ventrículos foram armazenados em solução de formol (10%) tamponado para as análises histológicas.

Após 24h em solução de formol, os tecidos cardíacos foram processados, incluídos em parafina e cortados em micrótomo manual rotativo (LEICA), com espessura de 5 μm . Posteriormente os tecidos foram corados com hematoxilina/eosina (H&E) e Picrosirius *red* (*Sirius Red*), para avaliação de hipertrofia cardíaca e deposição de colágeno, respectivamente.

Para análise morfométrica dos órgãos, 10 campos por lâminas de cada animal foram fotografados, com o auxílio de um software de obtenção de imagens (Motic Cam Plus[®]), no aumento de 400X e o número de núcleo de miócitos por campo e a área do núcleo de miócitos foi compilada utilizando o software livre Image J[®], assim como o percentual de colágeno tipo I, sob a luz polarizada, foi obtido em cada grupo de tratamento (Tachaudomdach et al., 2015; Franquni et al., 2013).

3.7 Dosagem dos níveis plasmáticos de 17 β -Estradiol (E2) e Testosterona

O sangue dos animais, foi levado a centrifuga (3000 rpm, 4^o C, 15 minutos) para a separação do soro e congelado (-80^o C) até o momento do uso. As análises bioquímicas para a determinação de testosterona e E2 foram realizadas por meio de kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) sendo estes: AccuBind[™] Testosterone EIA Test System Cod: 3725-300 e AccuBind Estradiol (E2) ELISA Cod: 4925-300 (Monobind Inc., EUA).

O teste se baseia no princípio de ligação competitiva entre o E2 ou Testosterona da amostra, que conjugam com peroxidase (fornecido pelo kit), por uma quantidade constante de anticorpo anti-estradiol ou testosterona de coelho. Os complexos formados são capturados por anticorpos de cabra anti-IgG de coelho impregnado nas cavidades da placa de ensaio. Após o tempo de reação e

lavagem, o substrato é adicionado e incubado resultando no desenvolvimento de coloração azul que é inversamente proporcional à concentração plasmática dos hormônios.

3.8 Determinação dos níveis proteicos por Western blot

A técnica utilizada para detecção da expressão das proteínas SERCA-2a, PLB, p-PLB (fosfo-treonina-17-fosfolambam; p-Thr17-PLB) e Trocador NCX no ventrículo esquerdo foi a de western blot, sendo utilizado o sistema descrito por Laemmli (1970).

Oitenta miligramas de tecido do ventrículo esquerdo foram homogeneizados em tampão de lise (100 mmol/L de NaCl, 50 mmol/L de Tris-base, 5 mmol/L de EDTA, 2 Na, 50 mmol / L de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 1 mmol / L de MgCl_2 , 1% de Nonidet P40, 0,3% de Triton x-100 e 0,5% de desoxicolato de sódio, pH = 8), contendo inibidor de protease (Sigma Fast, Sigma, EUA) e inibidores de fosfatase (20 mmol/L de NaF, 1 mmol/L de Na_3VO_4). As proteínas totais foram medidas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Cinquenta microgramas de proteína foram diluídos em tampão (5x - 2M Tris, pH = 6,8, 20% glicerol, 30% SDS, 25% mercaptoetanol, 0,1% Bromophenol Blue) e foram separados por eletroforese usando SDS-PAGE. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Millipore, MA, EUA). Após incubação com solução de bloqueio (Tris 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,6, Tween a 0,05% e albumina a 4%), as membranas foram incubadas a 4°C, durante a noite com anticorpos específicos primários: anti-SERCA-2a ([1:2500 , Abcam, Cambridge, MA, EUA), anti-PLB ([1: 1000], Abcam, Cambridge, MA, EUA), anti-p-Thr17-PLB ([1: 1000], Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-NCX ([1: 1000], Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) e anti-gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) ([1:3000] Santa Cruz Biotecnologia, Santa Cruz, CA, EUA). Em seguida, as

membranas foram lavadas (5 min três vezes) e incubadas durante duas horas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (HRP) [1:15.000]: anti-IgG *mouse* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) anti-IgG *goat* (Milipore, Bedford, EUA) e anti-IgG *rabbit* (Milipore, Bedford, EUA). As bandas imunorreativas foram detectadas com uma reação de quimioluminescência utilizando substrato de peroxidase (*Luminata HRP Substrate-Milipore*) e depois foram expostas a uma película de raios X. A análise densitométrica foi avaliada utilizando o software ImageJ, versão 1.48 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Em cada ensaio experimental fez-se a normalização em relação ao controle, sendo GAPDH para SERCA-2a, PLB total e NCX, com vista a diminuir os possíveis erros associados às variações nas concentrações das proteínas. Para análise do p-Thr17-PLB foi realizado a razão p-Thr17-PLB/PLB total. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (UA).

3.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 6 (Graph Pad Software, La Jolla, CA – USA). A comparação entre as médias foi avaliada utilizando análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Para os hormônios as diferenças entre as médias foram determinadas por análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste *post hoc* de Newman-Keuls. As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1. Avaliação dos parâmetros ponderais

Ao longo do experimento a massa corporal dos animais experimentais foi medida. Na tabela 1, encontram-se os resultados obtidos em relação às massas finais nos grupos controle (C), tratado com decanoato de nandrolona (ND), grupo controle submetido a exercício físico resistido (CE) e grupo tratado com decanoato de nandrolona com associação de exercício físico resistido (NDE). No início do tratamento não houve diferença significativa nas massas corporais dos animais entre os grupos (C: 201 ± 2 ; ND: 202 ± 4 ; CE: 203 ± 3 ; NDE: 203 ± 5 g). Porém, ao final do período experimental os animais tratados com decanoato de nandrolona (grupos ND e NDE) apresentaram um aumento significativo da massa corporal, quando comparados aos grupos que não foram tratados com decanoato de nandrolona (grupos C e CE), independente da associação ao exercício.

Grupo	Massa corporal final (g)
C	287 ± 5
ND	$323 \pm 6^{**}$
CE	279 ± 9
NDE	$317 \pm 8^{**}$

Na Figura 12 estão representados os valores de ganho de massa corporal dos animais, onde os animais tratados com decanoato de nandrolona tiveram um ganho de massa maior que os animais não tratados (C: $87,5 \pm 4,3$; ND: $123,6 \pm 8,6^{***}$; CE: $77,5 \pm 11$; NDE: $113,9 \pm 9,8^{***}$ g, $**p < 0,01$ em comparação com o grupo C e para $^*p < 0,05$ e $^{**}p < 0,01$ em comparação com o grupo CE).

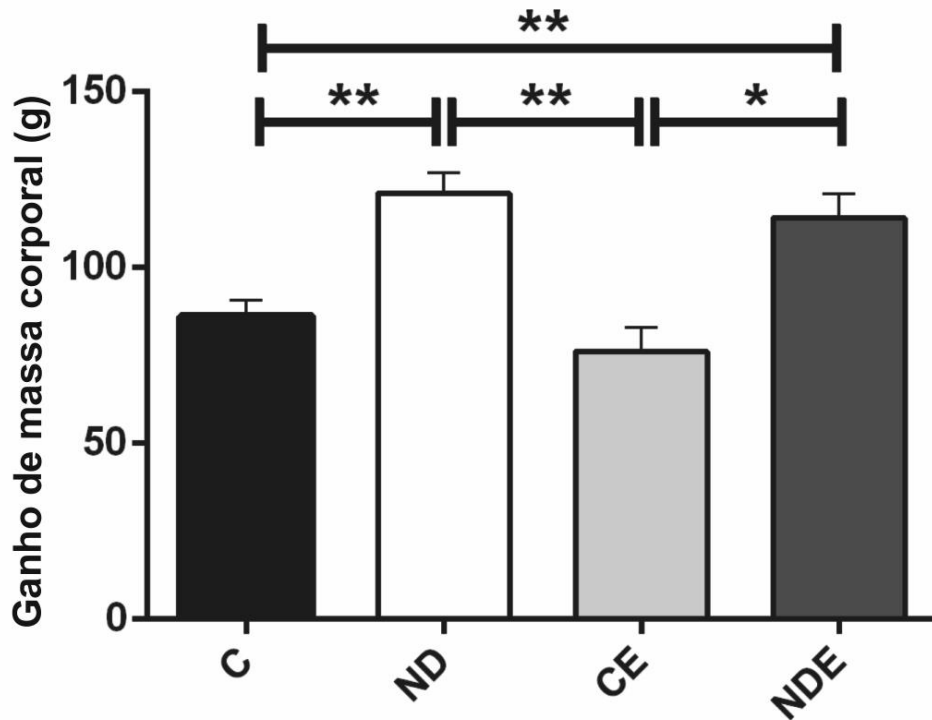


Figura 12: Ganho de massa corporal. Valores do ganho de massa corporal de ratas tratadas com DN e/ou submetidas a exercício físico resistido. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Para análise estatística foi utilizada ANOVA-1 via seguida de post hoc de Tukey. Os valores foram considerados significantes para * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

A eficiência anabólica do tratamento com DN foi avaliado por meio da relação massa do músculo gastrocnêmio pelo comprimento da tíbia. Pode-se observar que o tratamento, associado ou não ao exercício físico, promoveu aumento dessa relação, e que o exercício físico isolado não foi capaz de promover alteração (C: $0,44 \pm 0,023$; ND: $0,567 \pm 0,020^{***}$; CE: $0,443 \pm 0,011$; NDE: $0,489 \pm 0,02^{**}$ g/cm, Figura 13; ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo C e para * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo CE)

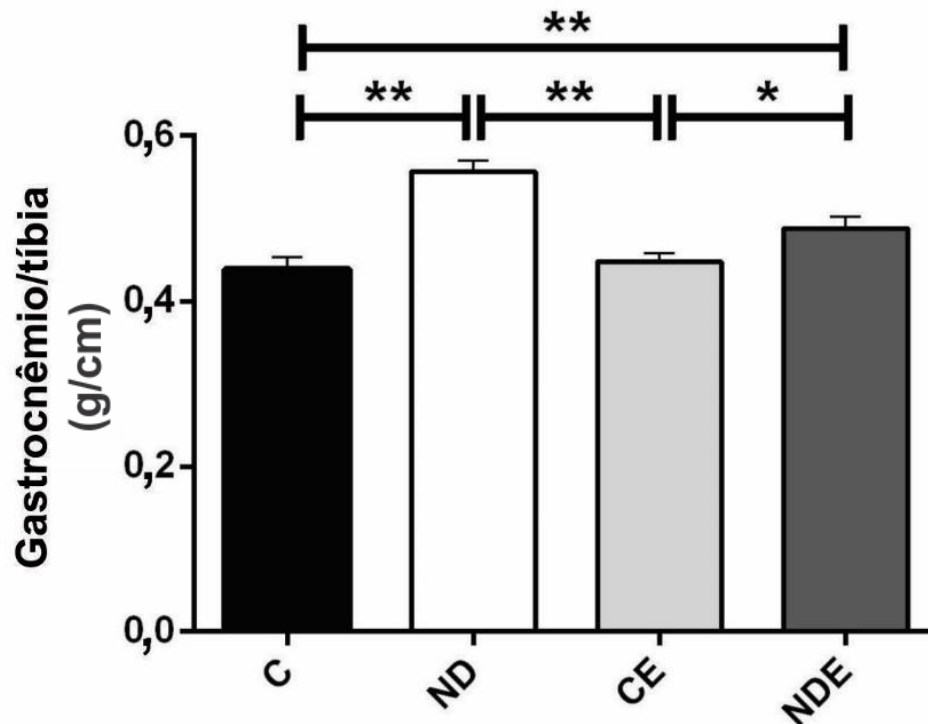


Figura 13: Hipertrofia do Gastrocnêmio. Avaliação da hipertrofia muscular e eficiência anabólica do DN, pela razão massa do gastrocnêmio/comprimento da tíbia nos diferentes grupos de tratamento. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Para análise estatística foi utilizada ANOVA-1 via seguida de post hoc de Tukey. Os valores foram considerados significantes para $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$.

4.2. Efeito da atividade física

A influência do DN sobre a eficiência do exercício físico resistido foi avaliado pela contagem do número de saltos por minuto dos animais, e revelou aumento do número de saltos apenas no grupo NDE (CE: $19,46 \pm 0,25$; NDE: $21,30 \pm 0,20^*$ saltos/minuto; $*p < 0,05$ quando comparado a CE; Tabela 3) e todos os grupos estavam em anaerobiose, como indicou a dosagem de lactato sanguíneo (CE: $10,68 \pm 0,9$; NDE: $10,29 \pm 0,8$; mmol/L; $*p < 0,05$ quando comparado a CE).

Tabela 2: Valores de lactato sanguíneo e número de saltos por minuto dos grupos submetidos ao exercício físico resistido

Grupos	Lactato sanguíneo (mmol/L)	Número de saltos por minuto
CE	10,68 ± 0,9	19,46 ± 0,25
NDE	10,29 ± 0,8	21,30 ± 0,20*

Os dados estão expressos como média ± E.P.M. Para análise estatística foi utilizada ANOVA-1 via seguida de post hoc de Tukey. Os valores foram considerados significantes para *p<0,05 e **p<0,01.

4.3. Efeito do tratamento com decanoato de nandrolona e/ou exercício físico resistido sobre os parâmetros histológicos de ratas

4.3.1 Avaliação da hipertrofia cardíaca

A hipertrofia foi avaliada microscopicamente (Figura 14), por meio da morfometria dos cardiomiócitos, sendo observado uma diminuição do número de núcleos de miócitos por campo no animais tratados com decanoato de nandrolona e/ou nos animais submetidos ao exercício físico resistido (C: 8,23 ± 1,23; ND: 3,66 ± 0,89^{**++}; CE: 5,44 ± 1,03*; NDE: 3,22 ± 0,64^{**++} em unidades arbitrárias, Figura 14B; *p<0,05 e **p<0,01 em comparação com o grupo C e ++p<0,01 em comparação com o grupo CE), indicando aumento da área ocupada pelos cardiomiócitos, sugerindo hipertrofia cardíaca. Para confirmação da hipertrofia, foi analisada a área dos cardiomiócitos, que por sua vez, nos grupos tratados com decanoato de nandrolona e/ou submetidos ao exercício físico, apresentaram valores aumentados em relação ao grupo controle (C: 1016,14 ± 46; ND: 1380,36 ± 88^{**++}; CE: 1186,08 ± 58^{**}; NDE: 1361,81 ± 48^{**++} μm², Figura 14C; **p<0,01 em comparação com o grupo C e ++p<0,01 em comparação com o grupo CE).

Para a diferenciação do tipo de hipertrofia, se concêntrica ou excêntrica, mediu-se a largura e comprimento do núcleo dos cardiomiócitos, tendo como resultado apenas o aumento na largura (C: 15,22 ± 2; ND: 21,85 ± 3^{**++}; CE: 17,25 ±

4^{**}; NDE: $20,78 \pm 3^{***}$; μm , Figura 14D; $**p < 0,01$ em comparação com o grupo C e $^{**}p < 0,01$ em comparação com o grupo CE), sem alteração do comprimento dos cardiomiócitos (C: $59,72 \pm 5$; ND: $62,94 \pm 7$; CE: $61,50 \pm 6$; NDE: $62,29 \pm 7$, μm , Figura 14E), nos animais tratados e/ou submetidos ao exercício físico resistido, indicando uma hipertrofia concêntrica.

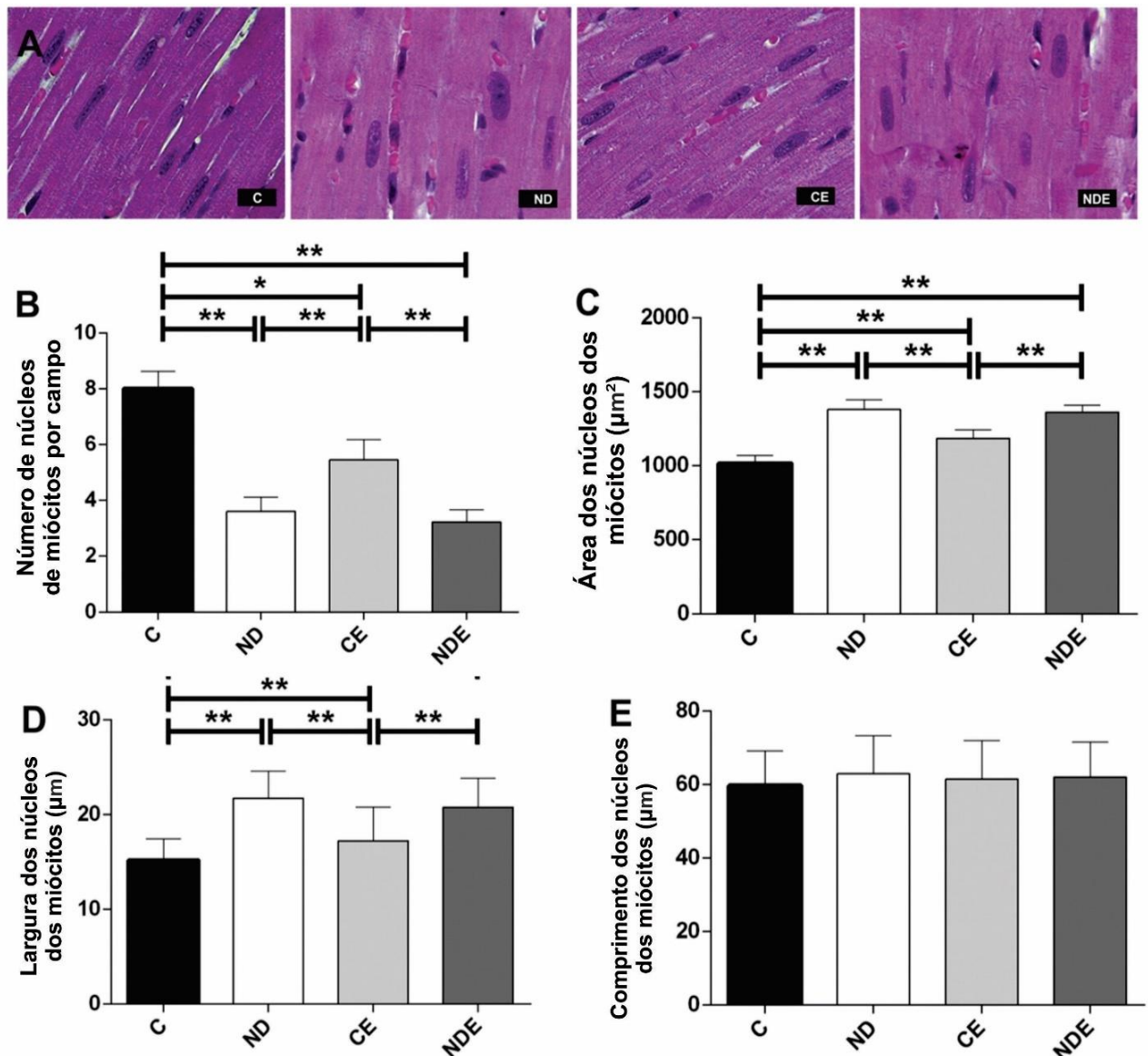


Figura 14: Análise histológica do ventrículo esquerdo para avaliação da Hipertrofia cardíaca.

Figuras representativas das lâminas coradas com H&E usadas para a avaliação da morfometria cardíaca; Painel A: imagem representativa da análise histológica em aumento de 400x. Painel B:

Representação gráfica da contagem de núcleo de miócitos por campo, Painel C: Representação gráfica da área dos núcleos dos miócitos (μm^2), Painel D: Representação gráfica da largura dos núcleos dos miócitos (μm), Painel E: Representação gráfica do comprimento dos núcleos dos miócitos (μm). Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Para análise estatística foi utilizada ANOVA-1 via seguida de post hoc de Tukey. Os valores foram considerados significantes para * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.3.2 Avaliação da deposição de colágeno no tecido cardíaco

Outro parâmetro histológico avaliado no ventrículo esquerdo, foi a deposição de colágeno. O grupo tratado com decanoato de nandrolona apresentou uma deposição de colágeno aumentada em relação aos grupos não tratados, no entanto, a associação com o exercício físico resistido foi capaz de reduzir a deposição do colágeno cardíaco (C: $2,138 \pm 0,52$; ND: $3,505 \pm 0,63^{**++}$; CE: $2,231 \pm 0,25$; NDE: $2,903 \pm 0,16^{*+}$ %, Figura 15C; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo C e para + $p < 0,05$ e ++ $p < 0,01$ em comparação com o grupo CE).

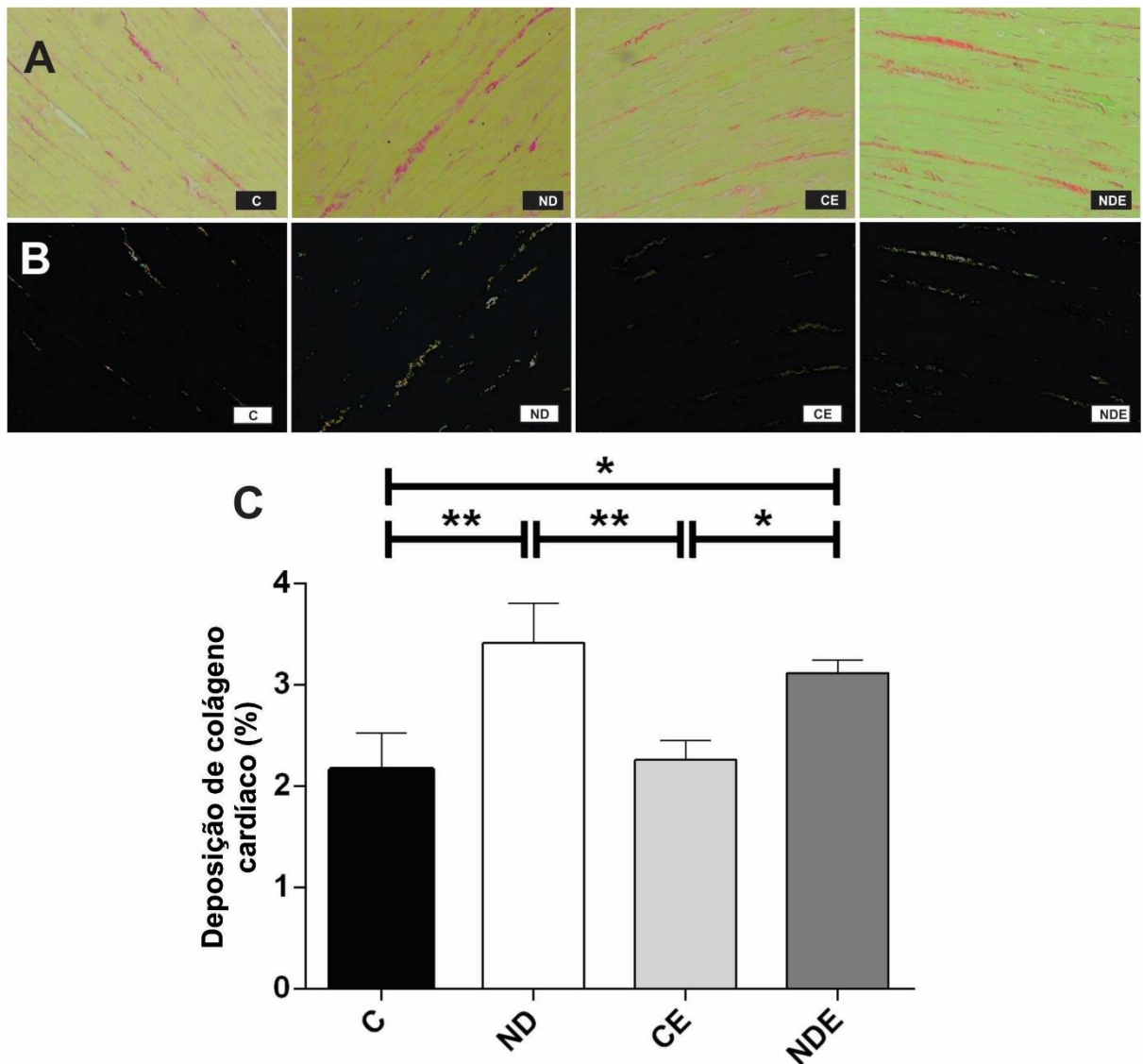


Figura 15: Análise histológica do ventrículo esquerdo para avaliação da deposição de colágeno cardíaco. Figuras representativas das lâminas coradas com picrossirios usadas para a avaliação da deposição de colágeno no ventrículo esquerdo; Painel A: imagem representativa da análise histológica em aumento de 400x. Painel B: imagem representativa da análise histológica com polarização em aumento de 400x, Painel C: Representação gráfica da porcentagem da área de colágeno depositado no tecido cardíaco. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Para análise estatística foi utilizada ANOVA-1 via seguida de post hoc de Tukey. Os valores foram considerados significantes para * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.4. Efeito do tratamento com decanoato de nandrolona e/ou exercício físico resistido sobre os parâmetros cardiovasculares e da função ventricular esquerda

4.4.1. Avaliação da PAM e FC

Não foi observada alteração na PAM (C: 104 ± 5 ; ND: 108 ± 4 ; CE: 106 ± 7 ; NDE: 104 ± 7 ; OVXDE: 111 ± 2 mmHg) ou FC (C: 357 ± 17 ; ND: 376 ± 10 ; CE: 333 ± 15 ; NDE: 343 ± 15 ; bpm) em nenhum dos grupos tratados.

4.4.2. Avaliação da pressão sistólica do ventrículo esquerdo

A pressão intraventricular foi avaliada no protocolo experimental e o tratamento com DN promoveu elevação na pressão sistólica do ventrículo esquerdo, nem mesmo a associação com o exercício resistido foi capaz de reduzir esta elevação na pressão sistólica. O exercício físico resistido isoladamente não promoveu alteração neste parâmetro (Figura 16; C: 102 ± 8 ; ND: $137 \pm 9^{***}$; CE: 104 ± 8 ; NDE: $124 \pm 7^{***}$ mmHg; $**p < 0,01$ em comparação com o grupo C e $^{**}p < 0,01$ em comparação com o grupo CE).

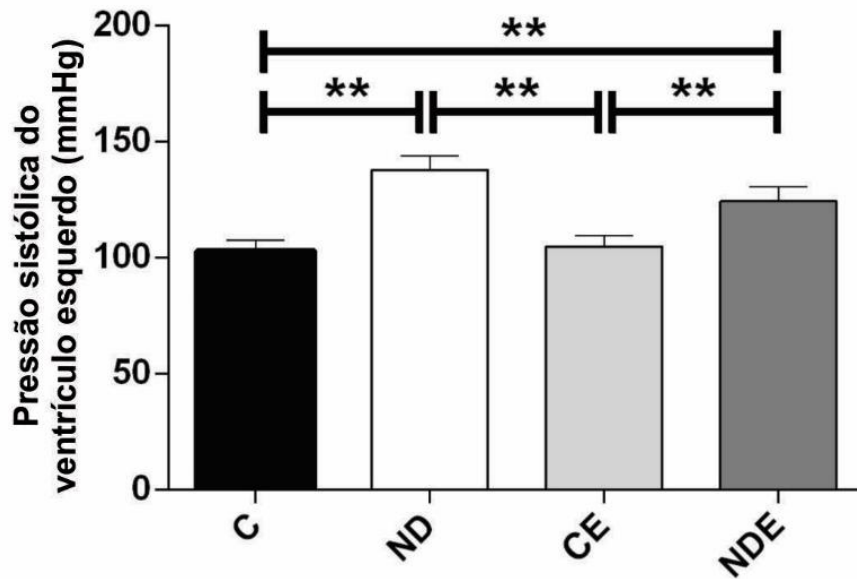


Figura 16: Avaliação da pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE). Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Para análise estatística foi utilizada ANOVA-1 via seguida de post hoc de Tukey. Os valores foram considerados significantes para * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.4.3. Avaliação da contratilidade do ventrículo esquerdo

A contratilidade ventricular esquerda foi avaliada por meio do parâmetro da $+dP/dt_{\text{máx}}$, representado na Figura 17, na qual o tratamento isolado com DN e a associação ao exercício físico resistido aumentaram os valores desta derivada, indicando uma contratilidade aumentada do ventrículo esquerdo. O exercício físico resistido também elevou os valores da $+dP/dt_{\text{máx}}$, porém com menor intensidade que nos grupos tratados com DN (C: $4549,67 \pm 189$; ND: $7174,38 \pm 423^{****}$; CE: $5519,03 \pm 419^{**}$; NDE: $6792,58 \pm 314^{****}$ mmHg/s; ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo C e ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo CE).

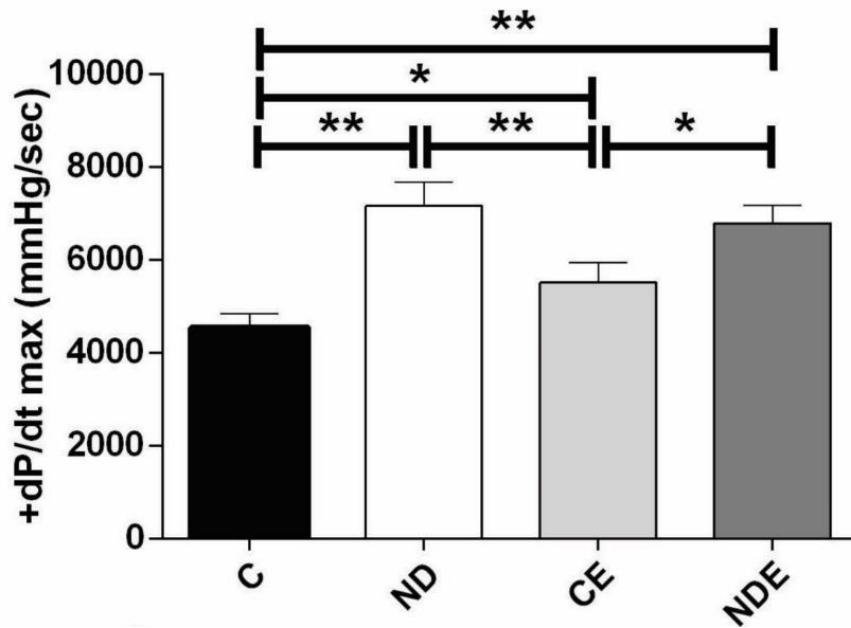


Figura 17: Avaliação da função sistólica do ventrículo esquerdo. Imagem representativa dos valores máximos da primeira derivada da pressão ventricular esquerda ($+dP/dt_{\text{máx}}$; mmHg). Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Para análise estatística foi utilizada ANOVA-1 via seguida de post hoc de Tukey. Os valores foram considerados significantes para $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$.

4.4.4. Avaliação do relaxamento do ventrículo esquerdo

A influência do tratamento com DN e o exercício físico resistido sobre o relaxamento do ventrículo esquerdo, foi realizada pela análise de dois parâmetros importantes, a $-dP/dt_{\text{min}}$ (Figura 18A) e o Tau (Figura 18B). O tratamento com DN foi capaz de reduzir ambos os parâmetro $-dP/dt_{\text{min}}$ e Tau, assim como a associação com o exercício físico. O exercício físico resistido também reduziu os valores de $-dP/dt_{\text{min}}$ e Tau (C: $0,0229 \pm 0,004$; ND: $0,0167 \pm 0,006^{**}$; CE: $0,0182 \pm 0,010^{**}$; NDE: $0,0173 \pm 0,0016^{**}$ s; $**p < 0,01$ em comparação com o grupo C) porém a redução em $-dP/dt_{\text{min}}$ foi inferior ao tratamento com DN (C: $-2810,24 \pm 209$; ND: $-5262,74 \pm 123^{****}$; CE: $-3471,94 \pm 365^{**}$; NDE: $-3582,03 \pm 154^{****}$ mmHg/s;

**p<0,01 em comparação com o grupo C e ++p<0,01 em comparação com o grupo CE).

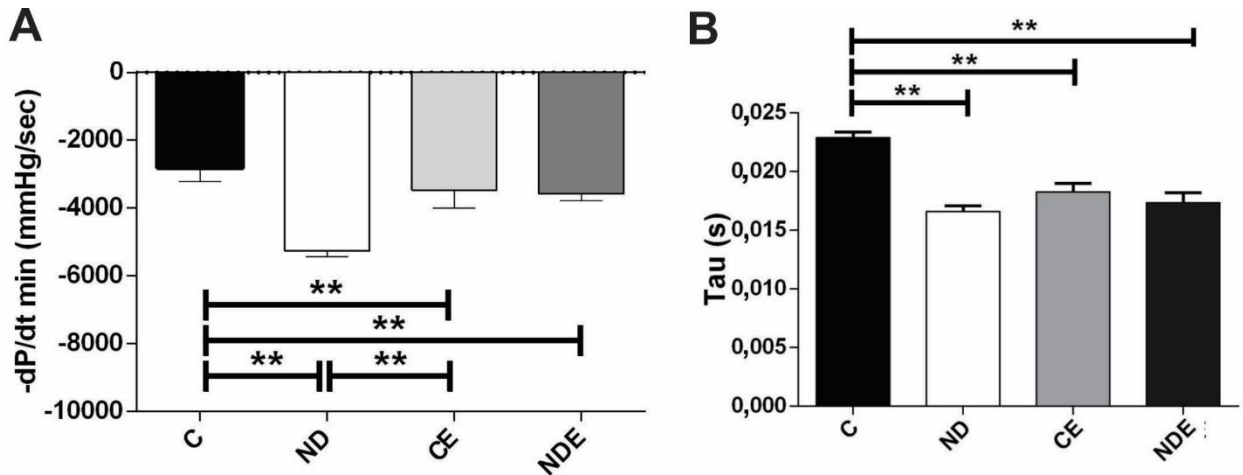


Figura 18: Avaliação da função diastólica do ventrículo esquerdo. Painel A: imagem representativa dos valores mínimos da primeira derivada da pressão ventricular esquerda (-dP/dt_{min}; mmHg), Painel B: imagem representativa da constante de tempo do relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo (Tau; segundos). Os dados estão expressos como média ± E.P.M. Para análise estatística foi utilizada ANOVA-1 via seguida de post hoc de Tukey. Os valores foram considerados significantes para *p<0,05 e **p<0,01.

4.5. Avaliação da Expressão das proteínas envolvidas no transiente de Ca²⁺

4.5.1. Expressão proteica da SERCA-2a no ventrículo esquerdo

Na Figura 19, estão representados os resultados da expressão da SERCA-2a no ventrículo esquerdo, onde apenas o tratamento com DN foi capaz de aumentar a expressão desta proteína (C: 0,275 ± 0,002; ND: 0,534 ± 0,083^{*###}; CE: 0,293 ± 0,045^{*}; NDE: 0,196 ± 0,004; *p<0,05 e **p<0,01 em comparação com o grupo C, ⁺p<0,05 e ⁺⁺p<0,01 em comparação com o grupo CE e [#]p<0,05 e ^{##}p<0,01 em comparação com o grupo NDE).

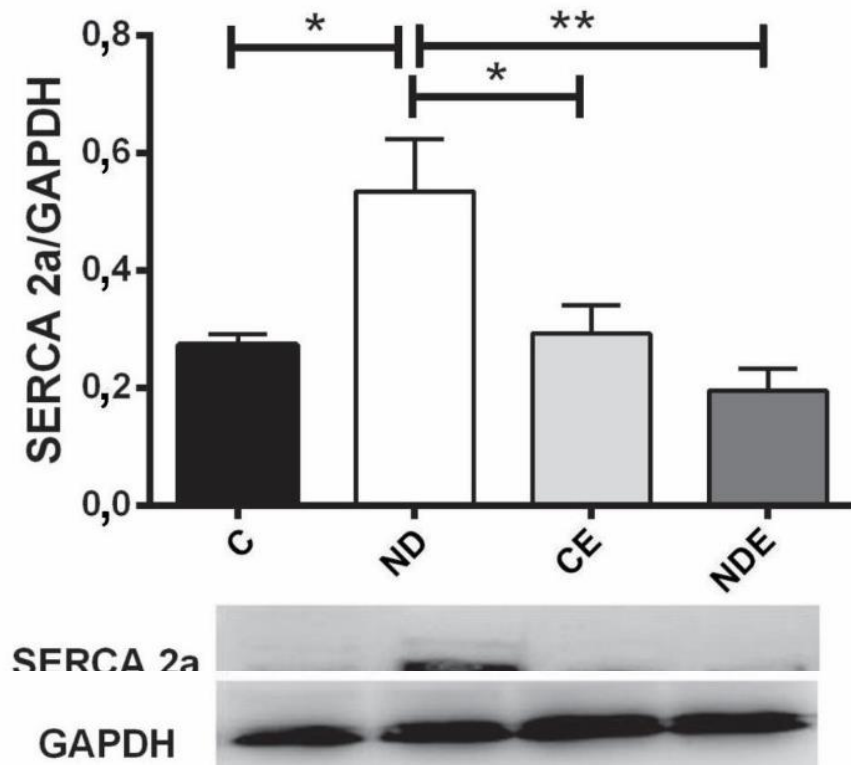


Figura 19: Expressão proteica da SERCA-2a em ventrículos esquerdos. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Para análise estatística foi utilizada ANOVA-1 via seguida de post hoc de Tukey. Os valores foram considerados significantes para * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

4.5.2. Expressão proteica da PLB no ventrículo esquerdo

Em relação a expressão da fosfolambam no ventrículo esquerdo, foram analisadas a PLB total (Figura 20A) e a p-Thr17-PLB (Figura 20B). Apenas o grupo submetido a exercício físico resistido apresentou redução na expressão da PLB, o tratamento com DN não alterou a expressão desta proteína (C: $1,023 \pm 0,145$; ND: $0,789 \pm 0,056$; CE: $0,504 \pm 0,156^{**}$; NDE: $0,688 \pm 0,245$; ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo C. A razão da expressão da PLB fosforilada (p-Thr17-PLB) em relação a PLB total se mostrou aumentada nos grupos tratados com DN, porém no grupo CE o aumento foi superior ao grupo ND (C: $0,569 \pm 0,001$; ND: $0,962 \pm 0,08^{*}$; CE: $1,432 \pm 0,004^{***\&\&}$; NDE: $0,667 \pm 0,256$; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em comparação com o

grupo C, $p < 0,01$ em comparação com o grupo ND e $p < 0,01$ em comparação com o grupo NDE).

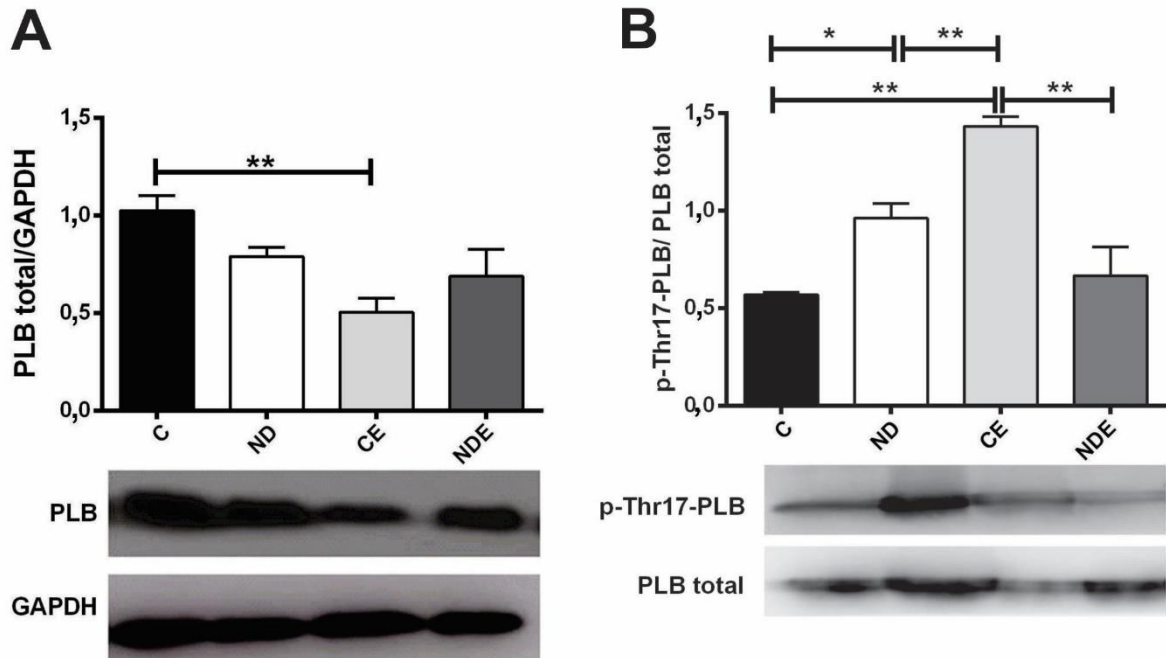


Figura 20: Expressão proteica da fosfolambam em ventrículos esquerdos. Paine A: imagem representativa dos valores da fosfolambam total (PLB total), Paine B: imagem representativa dos valores de fosfolambam fosforilada (p-Thr17-PLB). Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Para análise estatística foi utilizada ANOVA-1 via seguida de post hoc de Tukey. Os valores foram considerados significantes para $p < 0,05$ e $p < 0,01$.

4.5.3. Expressão proteica do NCX

O resultado da expressão proteica do NCX, representada na Figura 21, apenas se mostrou aumentada no grupo submetido ao exercício físico resistido, por sua vez, o tratamento com DN não interferiu com a expressão desta proteína (C: $0,518 \pm 0,085$; ND: $0,297 \pm 0,056$; CE: $0,881 \pm 0,21$ ^{##}; NDE: $0,321 \pm 0,15$; $p < 0,01$ em comparação com o grupo ND e $p < 0,05$ em comparação com o grupo NDE).

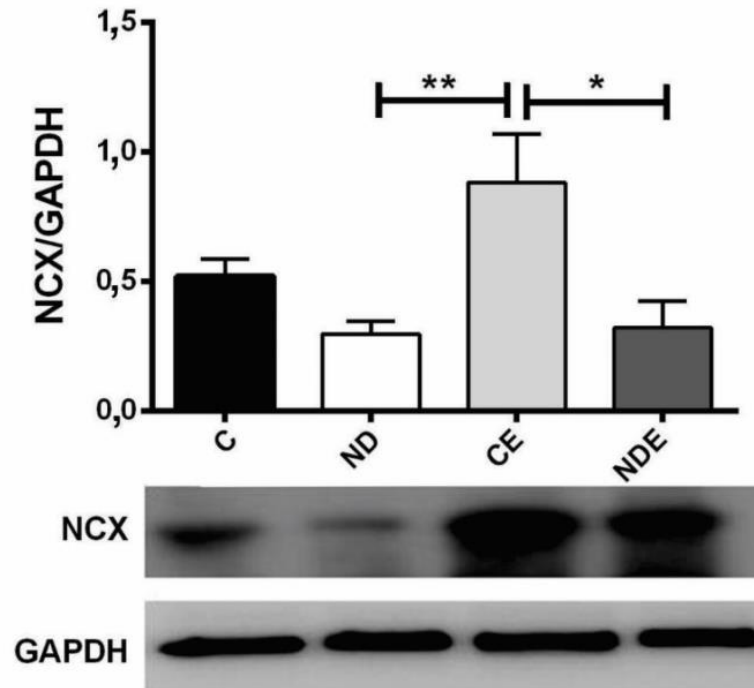


Figura 21: Expressão proteica do Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) em ventrículos esquerdos. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Para análise estatística foi utilizada ANOVA-1 via seguida de post hoc de Tukey. Os valores foram considerados significantes para $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$.

4.6. Avaliação dos níveis hormonais

Os níveis de E2 das ratas submetidas ao tratamento com DN se mostraram reduzidos (Tabela 3), enquanto os níveis hormonais de testosterona, por outro lado, apresentaram-se aumentados em todos os animais submetidos ao tratamento com DN.

Tabela 3: Valores de testosterona e estrogênio séricos das ratas tratadas e/ou submetidas a exercício físico resistido por 4 semanas.

Grupo	Estrogênio (pg/mL)	Testosterona (pg/mL)
C	53 \pm 2	0,2133 \pm 0,0103
ND	31 \pm 3*	2,888 \pm 0,2496*
CE	64 \pm 8	0,1479 \pm 0,013
NDE	32 \pm 1*	1,364 \pm 0,1458*

Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. Para análise estatística foi utilizada ANOVA-1 via seguida de post hoc de Tukey. Os valores foram considerados significantes para $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, examinamos os efeitos do tratamento com dose supra fisiológica de DN em ratas, o que levou ao aumento da massa corporal, hipertrofia cardíaca, deposição de colágeno no coração e aumento da pressão sistólica, contratilidade e relaxamento ventricular esquerdo. As alterações hemodinâmicas podem estar associadas ao aumento da expressão dos componentes reguladores do cálcio citosólico (SERCA-2a e p-thr17-PLB/PLB total) que se mostraram alterados em função do tratamento com DN e no exercício físico resistido. O treinamento físico resistido também aumentou a massa corporal e promoveu hipertrofia cardíaca, porém, sem deposição de colágeno no miocárdio, além disso, quando associado ao tratamento com DN (grupo NDE) o exercício não foi capaz de prevenir todas as alterações causadas pelo EAA (figura 22).

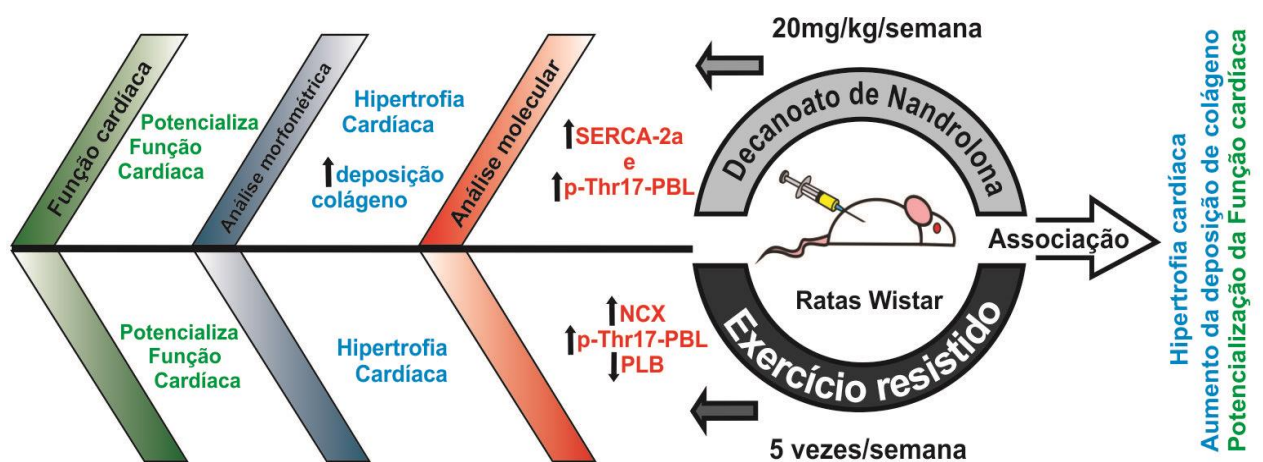


Figura 22: Resumo dos resultados. Figura do acervo do LHE, elaborada por Andrews Marques do Nascimento, 2017.

A avaliação da intensidade do exercício físico no presente estudo foi realizada com análise de lactato sanguíneo. Os valores encontrados nos grupos de exercícios (CE e NDE) foram $> 7\text{mmol/L}$, indicativos de exercício anaeróbico em ambos os grupos e que os grupos foram submetidos ao mesmo esforço físico. No entanto, o tratamento

com nandrolona aumentou o número de saltos por minuto, indicando melhora na capacidade de realizar o exercício (Voltarelli, Gobarro e Mello, 2002).

O exercício físico, dependendo do seu tipo e intensidade, pode promover hipertrofia cardíaca excêntrica ou concêntrica. No caso da hipertrofia cardíaca excêntrica, o crescimento do cardiomiócito ocorre devido à adição de sarcômeros em série, permitindo ao coração aumentar a sua célula de tamanho no comprimento, enquanto na hipertrofia concêntrica, os sarcômeros são adicionados em paralelo, permitindo que o coração aumente seu tamanho celular no diâmetro (Garcia e Incerpi, 2008). No entanto, a hipertrofia cardíaca concêntrica nem sempre é hipertrofia cardíaca patológica, podendo ser causada por sobrecarga hemodinâmica, como exercício dinâmico ou isométrico (Tanno et al., 2011). No presente estudo, o exercício resistido induziu hipertrofia cardíaca concêntrica e a associação com tratamento com nandrolona também manteve hipertrofia concêntrica. Nossos resultados corroboraram os achados de Stolt et al. (1999) que relataram que usuários de altas doses de EAA praticantes de exercícios resistidos mostraram hipertrofia ventricular esquerda. Tanno et al. (2011) mostraram hipertrofia cardíaca concêntrica em ratos tratados com nandrolona, independentemente do treinamento resistido de alta intensidade. Mesmo em outros modelos de exercício, como de resistência (*Endurance*), do tipo corrida ou natação, está presente a associação com hipertrofia cardíaca promovida pelo DN (Ghorbani et al, 2015; Abdollahi et al., 2016; Binayi et al., 2016). A hipertrofia cardíaca no sexo masculino, causada por EAA, está bem estabelecida e conhecida (Bissoli et al., 2009; Tanno et al., 2011; Andrade et al., 2011; Franquni et al., 2013). Entretanto, as avaliações no sexo feminino foram limitadas. Ozdemir et al. (2013) demonstraram que o uso do enantato de metelonona, um EAA, em ratas púberes promoveu hipertrofia muscular e hipertrofia

cardíaca ventricular esquerda, com tratamento agudo e crônico. De forma semelhante neste estudo o tratamento com DN causou hipertrofia cardíaca concêntrica nas fêmeas. Wang et al. (2015) evidenciaram a cardioproteção contra hipertrofia cardíaca em fêmeas, conferida pelo estrogênio, todavia, quando associado ao tratamento com EAA, ocorre redução parcial da produção estrogênica e cardioproteção (Bordbar et al., 2014). O ciclo estral de ratas sofre influência de hormônios sexuais, por agirem no eixo hipotálamo-hipofisário, testosterona quando em excesso podem interromper o ciclo das ratas, reduzindo a produção de estrogênio (Tandon e Chintala, 2001; Gerez et al., 2005). De Visser e Overbeek (1960) evidenciaram que DN é capaz de interferir no ciclo estral das ratas na dose de 0,25 mg/Kg e a partir de 1,0 mg/Kg promove ação antiestrogênica. No presente estudo, também evidenciamos a interferência do tratamento com DN no ciclo estral, no qual as fêmeas tratadas ficaram em diestro 2, com redução dos níveis plasmáticos de estrogênio. Portanto, é possível inferir que a menor hipertrofia cardíaca em ratas comparado com machos, evidenciada no presente estudo, tenha relação com esta redução estrogênica causada pelo tratamento com EAA.

Os hormônios sexuais também têm relação com o remodelamento cardíaco, a exemplo do E2 que pode influenciar na regulação do crescimento de fibroblastos cardíacos, participando do remodelamento do miocárdio e deposição da matriz extracelular (Powell et al., 1999). Dubey et al. (1998) verificaram que E2, foi capaz de inibir a síntese de colágeno por fibroblastos cardíacos e sua proliferação em resposta a soro fetal de vitelo a 2,5%. No entanto, Mercier et al. (2002) descobriram que os níveis fisiológicos de E2 (1 nmol/L) não tinham efeito sobre a proliferação de fibroblastos cardíacos, embora em níveis farmacológicos (1 mmol/L) reprimiram a proliferação. Andrógenos também exercem papel importante na modulação da

fibrose cardíaca. Em situações de insuficiência cardíaca, reposição com Testosterona pode suprimir a diferenciação dos fibroblastos aos miofibroblastos cardíacos, por meio do bloqueio da angiotensina II (Ang II), aliviando as propriedades pró fibróticas do estresse oxidativo e regulando a via de sinal do Fator de transformação do crescimento β (TGF- β) (Chung et al., 2013). No entanto, em concentrações elevadas de andrógenos este efeito parece se inverter, com consequente aumento da atividade da enzima conversora de Angiotensina (ECA) e aumento da deposição de colágeno cardíaco (Lima et al., 2015). A deposição de colágeno cardíaco se mostrou aumentada no grupo ND e foi parcialmente reduzida por associação com exercício resistido em animais NDE. Medugorac (1982) mostrou que o tecido intersticial dos corações de ratos consistia tipicamente em aproximadamente 2% de colágeno. Tanno et al. (2011) demonstraram que a hipertrofia cardíaca ocorreu em associação com deposição de colágeno em animais machos tratados com nandrolona e submetidos a exercício resistido. Um estudo prévio do nosso grupo mostrou alterações semelhantes em ratos tratados com DN, no qual a deposição de colágeno foi atribuída à influência exercida pelo EAA no sistema SRA e desequilíbrio de citocinas (Franquni et al., 2013). O acúmulo de colágeno associado à hipertrofia cardíaca geralmente contribui para a perda da capacidade contrátil do coração, com aumento da rigidez ou redução da complacência da parede ventricular, que pode resultar em insuficiência cardíaca (Jalil et al., 1989, Mady et al. 1999). De acordo com Nakayama et al. (1987) a fibrose miocárdica intersticial associada à hipertrofia de cardiomiócitos foi correlacionada com a deterioração do relaxamento miocárdico em pacientes com cardiomiopatia dilatada.

A função cardíaca tem sido comparada entre os gêneros no que diz respeito à

saúde, divergindo entre os sexos em relação ao desempenho cardíaco (Schaible e Scheuer, 1984, Parks e Howlett, 2013). Homens são mais propensos a desenvolverem insuficiência cardíaca com função sistólica prejudicada à medida que envelhecem em relação a mulheres (Regitz-Zagrosek e Seeland, 2012). Hayward et al. (2000) evidenciaram que homens e mulheres com insuficiência cardíaca, apresentam discrepância no tipo de disfunção ventricular, sendo sistólica e diastólica, respectivamente. Jessup et al. (2013) demonstraram que a castração de ratas promoveu disfunção diastólica e que o tratamento precoce e tardio com E2 atenuou a disfunção diastólica induzida por privação de estrogênio.

A contratilidade e relaxamento ventricular foram avaliados utilizando a primeira derivada ($+dP/dt_{max}$ e $-dP/dt_{min}$) e Tau. Apesar do tratamento com DN promover hipertrofia cardíaca patológica, em relação à contratilidade cardíaca e o relaxamento os resultados revelaram aumento nestes parâmetros. O exercício também influenciou positivamente a contratilidade e o relaxamento cardíaco, porém com menor intensidade quando comparado aos grupos tratados com DN. A literatura dispõe de poucos trabalhos que avaliam a influência do DN sobre a contratilidade cardíaca, com modelos experimentais distintos do presente estudo, em relação a gênero, tempo de tratamento e dose utilizada, forma de administração, possivelmente justificando a divergência encontrada nos resultados deste estudo. Trifunovic et al., (1995) demonstraram que o tratamento crônico com doses supra fisiológicas de DN em ratos causou hipertrofia cardíaca e redução da complacência do VE, sem modificar a contratilidade cardíaca. Norton et al. (2000) evidenciaram prejuízo na capacidade contrátil do miocárdio após tratamento crônico por 12 semanas em doses supra fisiológicas (5mg/Kg/quinzenal) de DN em ratos sedentários.

Em relação ao nosso estudo, utilizamos dois parâmetros para descrever o relaxamento isovolumétrico do VE na diástole: Tau e $-dP/dt_{min}$. Tau é definido como uma constante de tempo de relaxamento isovolumétrico, e é considerado um parâmetro mais preciso do que $-dP/dt_{min}$. Tau é o parâmetro mais confiável da taxa de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo. A taxa de diminuição da pressão intraventricular do ventrículo esquerdo, representada por este parâmetro, apresenta-se como um padrão para análise do relaxamento. Tau foi estudado como uma medida da função cardíaca eficaz, na qual a elevação da Tau foi associada com isquemia miocárdica e, portanto, é preferível um valor de Tau baixo (Thomas et al., 1992; Bai, 2008). De acordo com DeMey et al. (2001), a quantificação da taxa de relaxamento do ventrículo esquerdo em condições normais e patológicas é importante para a avaliação da função da bomba cardíaca. Também foi demonstrado que o distúrbio do relaxamento miocárdico foi um forte indicador do início da insuficiência cardíaca (Lorell, 1991; Leite-Moreira e Gillebert, 1994). Mais especificamente, a análise do período de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo tem sido utilizada como uma ferramenta para caracterizar a disfunção diastólica. Neste sentido, a disfunção diastólica é caracterizada pela falha do relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo, o que pode ser confirmado por uma constante Tau aumentada e uma diminuição do $-dP/dt_{min}$ (Verma e Solomon, 2009). No entanto, os grupos tratados com DN e também submetidos ao exercício apresentaram resultados opostos aos observados em situações de insuficiência cardíaca. Todos os grupos (CE, ND e NDE) mostraram uma constante de Tau reduzida e um índice de $-dP/dt_{min}$ aumentado. A avaliação das alterações funcionais cardíacas também revelou que o tratamento com DN, durante quatro semanas, aumentou a PSVE. Mesmo a associação com o exercício não impediu esse aumento

nos animais NDE.

Num esforço para clarificar estes resultados no que diz respeito ao relaxamento cardíaco e a contratilidade, foi realizada a análise molecular de determinadas proteínas que regulam o Ca^{2+} intracelular, que representa um importante e potencial alvo dos EAA em células musculares cardíacas e outros tipos de células. Os hormônios sexuais são capazes de regular a expressão de proteínas envolvidas no transiente de Ca^{2+} cardíaco. Er et al. (2007) descobriram que a aplicação aguda de concentrações de diidrotestosterona (100 nM) em cultura de miócitos ventriculares de ratas causou uma redução acentuada na corrente de Ca^{2+} . Curiosamente, esses autores também mostraram que o tratamento com quantidades semelhantes de diidrotestosterona por 24 h teve o efeito oposto, intensificando a corrente de Ca^{2+} . Outra evidência da influência dos hormônios sexuais sobre o transiente de Ca^{2+} é a diminuição de NCX e canais de Ca^{2+} tipo-L, em ratos castrados e quando submetidos à reposição com testosterona apresentam restauração da expressão proteica normal (Golden et al., 2002; Golden et al., 2004). A testosterona pode provocar a hipertrofia cardíaca por provocar liberação rápida de Ca^{2+} do RS, de forma dependentes e independente de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), que estão relacionadas com a expressão de genes e possíveis efeitos inotrópicos (Estrada et al., 2003; Vicencio et al., 2006). Embora não tenha sido de interesse do presente estudo avaliar o dimorfismo sexual, vale ressaltar que a expressão de SERCA-2a, PLB no ventrículo esquerdo e o conteúdo de Ca^{2+} do RS não diferem entre os gêneros (Chen et al., 2003). Chu et al. (2005) em estudo comparativo da diferença de gênero sobre a expressão de proteínas relacionadas com o transiente de Ca^{2+} em ratos, evidenciou que as proteínas NCX, RyR e canais de Ca^{2+} tipo-L são mais abundantes no ventrículo de fêmeas, sem interferir na expressão de

SERCA-2a, PLB e receptores β -adrenérgico (β -AR). Apesar de que, estudo de Schwertz et al. (2004) sugere que o miócitos ventriculares isolados de ratas são mais sensíveis ao Ca^{2+} que de ratos machos, necessitando de menos Ca^{2+} para gerar uma resposta contrátil semelhante.

Neste estudo, apenas o exercício aumentou a expressão de NCX, enquanto que nos grupos tratados com DN, mesmo a associação com o exercício não alterou a expressão deste trocador. O NCX é uma proteína presente no sarcolema que é responsável pela remoção de Ca^{2+} citosólico, pela troca de Na^+ extracelular, reduzindo a concentração citosólica de Ca^{2+} (Bordbar et al., 2014). Para manter um nível intracelular estável de Ca^{2+} , o NCX retira praticamente a mesma quantidade de Ca^{2+} da célula que entra na célula em cada batimento cardíaco (Bers et al., 1996). Normalmente o aumento na expressão do NCX quanto à diminuição da expressão da SERCA-2a resultam na redução do conteúdo de Ca^{2+} do RS, o que diminui a disponibilidade deste íon durante a ativação sistólica (Hasenfuss et al., 1998). Porém, o fluxo invertido destes íons coopera para a elevação de Ca^{2+} intracelular na fase inicial do platô e contribui para o aumento da contratilidade cardíaca, devido ao acúmulo de Ca^{2+} nos cardiomiócitos (Dipolo e Beaugé, 2006). No estudo de Sugizaki et al. (2011), o exercício aeróbio aumentou a expressão do mRNA NCX, além de aumentar a expressão de canal de Ca^{2+} tipo-L, aumentando o influxo de Ca^{2+} e a resposta contrátil cardíaca. Alguns estudos demonstraram aumento da expressão do NCX após o treinamento físico aeróbio em ratos com insuficiência cardíaca, melhorando a capacidade contrátil cardíaca (Yamamoto e Greeff, 1981; Fraysse et al., 2001).

Foi avaliada parcialmente neste estudo a funcionalidade do retículo saerocoplasmático pela expressão de SERCA-2a, PLB e p-PLB. O exercício reduziu

a PLB total em relação ao grupo controle, porém aumentou a fosforilação de PLB (p-PLB), sem interferir com SERCA-2a. A fosforilação do PLB é responsável pela sua inativação, resultando em maior atividade da SERCA-2a e conseqüentemente no aumento da captação de cálcio pelo RS, contribuindo para a facilitação do relaxamento e da contratilidade (Tada et al., 1975, Verboomen et al., 1992). Em um estudo conduzido por Kemi et al. (2007), o exercício também promoveu aumento da fosforilação da PLB (p-thr17-PLB), melhorando o processo de recaptação de Ca^{2+} . Já o tratamento com DN aumentou a expressão de SERCA-2a e p-Thr17-PLB. Poucos estudos avaliam a interferência dos EAA sobre a proteína SERCA-2a, com métodos variados e resultados discrepantes. Cruz et al. (2017) ao tratar cronicamente ratos com propionato de testosterona, não evidenciaram alteração na expressão de SERCA-2a. De forma semelhante, a castração de ratos espontaneamente hipertensos, machos e fêmeas não alterou a expressão proteica da SERCA-2a (Dalpiaz et al., 2015). No entanto, Witayavanitkul et al. (2013), após castrarem ratos verificaram redução na atividade da SERCA-2a e a reposição com testosterona reverteu o prejuízo na atividade desta proteína. Qi e Liu (2007) avaliaram a influência dos hormônios sexuais sobre a expressão e atividade da SERCA-2a no músculo genioglosso, onde o tratamento com estrogênio não alterou a atividade nem a expressão, em contrapartida o tratamento com testosterona diminuiu expressão e atividade da SERCA-2a.

Como citado anteriormente, tratamento com DN aumentou a expressão da p-Thr17-PLB, é possível que tenha relação com a CaMKII, que fosforila PLB no resíduo treonina-17, ativando conseqüentemente a SERCA-a. Wilson et al. (2013) identificaram o aumento da fosforilação da CaMKII em cultura de cardiomiócitos tratados com testosterona. Uma vez que CAMKII é um substrato bem conhecido de

quinases ativadas por receptor de angiotensina II (PKC e MAPK)(Ferreira et al., 2011) e que os andrógenos interferem no SRA (Rocha et al., 2007; Lima et al., 2015), é razoável que o tratamento com DN tenha aumentado a fosforilação da PLB no resíduo treonina-17.

Uma possível explicação para o aumento da contratilidade e relaxamento cardíaco e também o aumento dos componentes reguladores do cálcio citosólico, após tratamento com DN, seria a ativação autonômica simpática. A estimulação β -adrenérgica cardíaca aumenta tanto a contração como o relaxamento do músculo cardíaco ao alterar o influxo de Ca^{2+} do RS (Tsien, 1977; Tada e Katz, 1982). O aumento da fosforilação é notável no processo de estimulação β -adrenérgico pelas catecolaminas, mediada pela cascata de cAMP, sendo considerada responsável pelo aumento na velocidade de contração do miocárdio (Miyakoda et al., 1987). Em situações como na insuficiência cardíaca induzida por hiperatividade simpática ocorre aumento da atividade da CaMKII, culminando em aumento da fosforilação da PLB (Bartholomeu et al., 2008). Consistente com esta descoberta, a PLB estava presente apenas no músculo esquelético e no músculo cardíaco, promovendo a estimulação do transporte de Ca^{2+} de uma forma dependente de cAMP (Tada e Kirchberger, 1976).

Alguns estudos relacionaram o uso do EAA com o aumento da estimulação simpática (Nascimento e Medei, 2011; Turillazzi et al., 2011). Um estudo de Turillazzi et al. (2011) mostrou que doses supra fisiológicas de EAA em ratos, poderiam induzir hiperestimulação adrenérgica e lesão miocárdica, bem como disautonomia cardíaca. Nascimento e Medei (2011) encontraram um desequilíbrio autonômico cardíaco, com redução da modulação parassimpática cardíaca e aumento da modulação cardíaca simpática. O exercício, por sua vez, também influencia a

estimulação simpática (Drieu la Rochelle et al., 1991; Leosco et al., 2003; Donato et al., 2007). Maior et al. (2013) utilizando doses crônicas supra fisiológicas de nandrolona em ratos submetidos ao exercício físico, apresentaram disfunção autonômica parassimpática e também alterações na despolarização ventricular. No entanto, esta estimulação inicial do sistema nervoso autônomo, com a estimulação da capacidade contrátil em longo prazo, poderia desencadear a falência cardíaca por *downregulation* do β -AR (Ungerer et al., 1993; Woo and Xiao, 2012). Em nosso estudo, o protocolo utilizado pode não ter sido capaz de promover a disfunção cardíaca, mas um tratamento mais prolongado ou se os indivíduos fossem submetidos a alterações que levem a insuficiência cardíaca, poderiam induzir essa disfunção. Outro ponto importante a ser considerado é que estudamos ratas e grande parte dos estudos de contratilidade cardíaca e DN foram conduzidos em machos (Trifunovic et al., 1995; Norton et al., 2000).

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos dados sugerem que o decanoato de nandrolona e o exercício resistido em ratas, por um período de quatro semanas, foram capazes de promover hipertrofia cardíaca e aumentar a função cardíaca, alterando proteínas responsáveis pela regulação de Ca^{2+} intracelular. Entretanto, a hipertrofia causada pela nandrolona foi considerada uma condição patológica. Certamente, esta avaliação comparando o uso de nandrolona e a contratilidade cardíaca deve ser posteriormente investigada, especialmente com uso crônico, visto que as exacerbações prolongadas desses efeitos podem desencadear complicações cardíacas.

7 REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI F, JOUKAR S, NAJAFIPOUR H, KARIMI A, MASUMI Y, BINAYI F. The risk of life-threatening ventricular arrhythmias in presence of high-intensity endurance exercise along with chronic administration of nandrolone decanoate. *Steroids*. 2016 Jan; 105:106-12.

ADACHI T. Modulation of vascular sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase in cardiovascular pathophysiology. *Adv Pharmacol*. 2010; 59:165-95.

ANDRADE TU, LOIOLA LZ, ALCURE SM, MEDEIROS AR, SANTOS MC, MOYSÉS MR, ABREU GR, LENZ D, BISSOLI NS. Role of the renin-angiotensin system in the nandrolone decanoate induced attenuation of the Bezold-Jarisch reflex. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2011; v. 89, p. 891-897.

ANDRADE TU, SANTOS MCS, BUSATO VCW, MEDEIROS ARS, ABREU GR, MOYSÉS MR, BISSOLI NS. Higher physiological doses of nandrolone decanoate do not influence the Bezold-Jarish reflex control of bradycardia. *Archives of Medical Research*. 2008; v. 39, nº 1, p. 27-32.

ANGOORANI H, HALABCHI F. The Misuse of Anabolic-Androgenic Steroids among Iranian Re-creational Male Body-Builders and Their Related Psycho-Socio-Demographic factors. *Iran Journal of Public Health*. 2015; v. 44, nº 12, p. 1662-1669.

BADDELEY D, JAYASINGHE ID, LAM L, ROSSBERGER S, CANNELL MB, SOELLER C. Optical single-channel resolution imaging of the ryanodine receptor distribution in rat cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106:22275–22280.

BAHRKE MS, YESALIS CE. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr Opin Pharmacol*. 2004 Dec;4(6):614-20.

BAI X. Calculation of left ventricular relaxation time constant-Tau in patients with aortic regurgitation by continuous-wave Doppler. *Open Cardiovasc Med J.* 2008; 2:28-30.

BARAUNA VG, BATISTA ML JR, COSTA ROSA LF, CASARINI DE, KRIEGER JE, OLIVEIRA EM. Cardiovascular adaptations in rats submitted to a resistance-training model. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005 Apr; 32(4):249-54.

BARTHOLOMEU JB, VANZELLI AS, ROLIM NP, FERREIRA JC, BECHARA LR, TANAKA LY, ROSA KT, ALVES MM, MEDEIROS A, MATTOS KC, COELHO MA, IRIGOYEN MC, KRIEGER EM, KRIEGER JE, NEGRÃO CE, RAMIRES PR, GUATIMOSIM S, BRUM PC. Intracellular mechanisms of specific beta-adrenoceptor antagonists involved in improved cardiac function and survival in a genetic model of heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2008 Aug;45(2):240-9.

BASSANI RA, BASSANI JW, BERS DM. Mitochondrial and sarcolemmal Ca²⁺ transport reduce [Ca²⁺]_i during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *J Physiol* 1992, 453:591–608.

BASSANI JWM, BASSANI RA, BERS DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: speciesdependent differences in cellular mechanisms. *J. Physiol.* 476, 279–293 (1994).

BERNE RM, LEVY MN. As glândulas reprodutoras. In: BERNE, R.M.; LEVY, M.N. *Fisiologia.* 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 52, p.910-956.

BERS D, STIFFEL V. Ratio of ryanodine to dihydropyridine receptors in cardiac and skeletal muscle and implications for E-C coupling. *Am J Physiol* 1993, 264:C1587–C1593.

BERS DM, BASSANI JW, BASSANI RA. Na-Ca exchange and Ca fluxes during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. *Ann N Y Acad*

Sci. 1996 Apr 15;779:430-42.

BERS DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002 Jan 10;415(6868):198-205.

BERS DM. *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force*. 2nd ed. Boston, MA: Kluwer; 2001.

BHUPATHY P, BABU GJ, PERIASAMY M. 2007. Sarcolipin and phospholamban as regulators of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2007; 42(5): 903–911.

BINAYI F, JOUKAR S, NAJAFIPOUR H, KARIMI A, ABDOLLAHI F, MASUMI Y. The Effects of Nandrolone Decanoate Along with Prolonged Low-Intensity Exercise on Susceptibility to Ventricular Arrhythmias. *Cardiovasc Toxicol.* 2016 Jan;16(1):23-33.

BISSOLI NS, MEDEIROS ARS, SANTOS MCS, BUSATO VCW, JARSKE RD, ABREU GR, MOYSÉS MR, ANDRADE TU. Long-term treatment with supraphysiological doses of nandrolone decanoate reduces the sensitivity of Bezold-Jarisch reflex control of heart rate and blood pressure, *Pharmacological Research*. 2009; v. 59, p. 379-384.

BORDBAR H, MESBAH F, TALAEI T, DEGHANI F, MIRKHANI H. Modulatory effect of gonadotropins on rats' ovaries after nandrolone decanoate administration: a stereological study. *Iranian Journal of Medical Sciences*. 2014; v. 39, n° 1, p. 44-50.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

BRASIL GA, LIMA EM, NASCIMENTO AM, CALIMAN IF, MEDEIROS AR,

SILVA MS, ABREU GR, REIS AM, ANDRADE TU, BISSOLI NS. Nandrolone decanoate induces cardiac and renal remodeling in female rats, without modification in physiological parameters: The role of ANP system. *Life Sci.* 2015 Sep 15;137:65-73.

BRASIL, Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos. Brasília, DF, 2013.

BRAUNSTEIN GD. The Endocrine Society Clinical Practice Guideline and The North American Menopause Society position statement on androgen therapy in women: another one of Yogi's forks. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Nov;92(11):4091-3.

BRETTE F, ORCHARD C. T-tubule function in mammalian cardiac myocytes. *Circ Res.* 2003; 92:1182–1192.

BRICOUT VA, GERMAIN PS, SERRURIER BD, GUEZENNEC CY. Changes in testosterone muscle receptors: effects of an androgen treatment on physically trained rats. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1994 May;40(3):291-4.

BRILLA CG, JANICKI JS, WEBER KT. Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension. Role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries. *Circ Res.* 1991; 69: 107-15.

BROWN DA, JEW KN, SPARAGNA GC, MUSCH TI, MOORE RL. Exercise training preserves coronary flow and reduces infarct size after ischemia-reperfusion in rat heart. *J Appl Physiol.* 1985; 2003;95(6):2510-8.

BRUM JL. [Public health care services in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: 1930 and 1940]. *Rev Gaucha Enferm.* 2004 Apr;25(1):70-80. Portuguese.

BUENO OF, WILKINS BJ, TYMITZ KM, GLASCOCK BJ, KIMBALL TF,

LORENZ JN, MOLKENTIN JD. Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 2;99(7):4586-91. Calfee R, Fadale P. Popular ergogenic drugs and supplements in young athletes. *Pediatrics*. 2006 Mar;117(3): e577-89.

CATO ACB, NESTL A, MINK S. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*. 2002; n° 138, 2002.

CAVALARI FC, DE CASTRO AL, FRACASSO BDE M, LOSS EDA S. Non-classic androgen actions in Sertoli cell membrane in whole seminiferous tubules: effects of nandrolone decanoate and catechin. *Steroids*. 2012 Jan;77(1-2):118-25.

CELOTTI F, CESI PN. Anabolic steroids: a review of their effects on the muscles, of their possible mechanisms of action and of their use in athletics. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1992; v. 43, n° 5, p. 469-77.

CHAVES EA, PEREIRA-JUNIOR PP, FORTUNATO RS, MASUDA MO, DE CARVALHO AC, DE CARVALHO DP, OLIVEIRA MF, NASCIMENTO JH. Nandrolone decanoate impairs exercise-induced cardioprotection: role of antioxidant enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006 Jun;99(4-5):223-30.

CHAVES EA, PEREIRA-JUNIOR PP, FORTUNATO RS, MASUDAA MO, CARVALHO ACC, CARVALHO DP, OLIVEIRA MF, NASCIMENTO JHM. Nandrolone decanoate impairs exercise-induced cardioprotection: role of antioxidante enzymes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2006; v. 99, p. 223-230.

CHEN J, PETRANKA J, YAMAMURA K, LONDON RE, STEENBERGEN C, MURPHY E. Gender differences in sarcoplasmic reticulum calcium loading after isoproterenol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Dec;285(6):H2657-62.

CHU SH, SUTHERLAND K, BECK J, KOWALSKI J, GOLDSPINK P,

SCHWERTZ D. Sex differences in expression of calcium-handling proteins and beta-adrenergic receptors in rat heart ventricle. *Life Sci.* 2005 Apr 22;76(23):2735-49.

CHUNG CC, KAO YH, CHEN YJ, CHEN YJ. Androgen modulates cardiac fibrosis contributing to gender differences on heart failure. *Aging Male.* 2013 Mar;16(1):22-7.

COHN JN, FERRARRI R, SHARPE N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 35: 562-82.

CREUTZBERG EC, SCHOLS AM. Anabolic steroids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 1999 May;2(3):243-53.

CRUZ SEARA FA, BARBOSA RA, OLIVEIRA DF, SILVA DL, CARVALHO AB, FERREIRA AC, NASCIMENTO JH, OLIVARES EL. Administration of anabolic steroid during adolescence induces long-term cardiac hypertrophy and increases susceptibility to ischemia/reperfusion injury in adult Wistar rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017 Feb 5. pii: S0960-0760(17)30012-2.

CUNHA TS, MOURA MJCS, BERNARDES CF, TANNO AP, MARCONDES FK. Vascular sensitivity to phenylephrine in rats submitted to anaerobic training and nandrolone treatment. *Hypertension.* 2005; v. 46, nº 4, p. 1010–1015.

DARKE S, TOROK M, DUFLOU J. Sudden or unnatural deaths involving anabolic-androgenic steroids. *Journal of Forensic Sciences.* 2014; v. 59, nº 4, p. 1025- 1028.

DASH R, FRANK KF, CARR AN, MORAVEC CS, KRANIAS EG. Gender influences on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-handling in failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2001 Jul;33(7):1345-53.

DE MEY S, THOMAS JD, GREENBERG NL, VANDERVOORT PM,

VERDONCK PR. Assessment of the time constant of relaxation: insights from simulations and hemodynamic measurements. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Jun;280(6):H2936-43.

DE VISSER, OVERBEEK GA. Pharmacological properties of nandrolone decanoate. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1960 Nov;35:405-12.

DIAMOND MI, MINER JN, YOSHINAGA SK, YAMAMOTO KR. Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element, *Science*. 1990; 249 1266–1272.

DIPOLO R, BEAUGÉ L. Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. *Physiol Rev*. 2006 Jan;86(1):155-203.

DOBESH DP, KONHILAS JP, DE TOMBE PP. Cooperative activation in cardiac muscle: Impact of sarcomere length. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: H1055–H1062.

DONATO AJ, LESNIEWSKI LA, DELP MD. Ageing and exercise training alter adrenergic vasomotor responses of rat skeletal muscle arterioles. *J Physiol*. 2007 Feb 15;579(Pt 1):115-25.

DORN GW 2nd, Robbins J, Sugden PH. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res*. 2003; 92:1171-1175.

DORN GW 2nd. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 2007 May;49(5):962-70.

DOUGLAS PS, KATZ SE, WEINBERG EO, CHEN MH, BISHOP SP, LORELL BH. Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressureoverload. *J Am Coll Cardiol*. 1998 Oct;32(4):1118-25.

DOUMIT ME, COOK DR, MERKEL RA. Testosterone up-regulates androgen receptors and decreases differentiation of porcine myogenic satellite cells in vitro.

Endocrinology. 1996 Apr;137(4):1385-94.

DRIESEN RB, VERHEYEN FK, DEBIE W, BLAAUW E, BABIKER FA, CORNELUSSEN RNM. Reexpression of alpha skeletal actin as a marker for dedifferentiation in cardiac pathologies. *J Cell Mol Med*. 2009; 13(5):896-908.

DRIEU LA ROCHELLE C, BERDEAUX A, RICHARD V, GIUDICELLI JF. Coronary effects of a combined beta adrenoceptor blocking and calcium antagonist therapy in running dogs. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1991 Dec;18(6):904-10.

DUBEY RK, GILLESPIE DG, JACKSON EK, KELLER PJ. 17Beta-estradiol, its metabolites, and progesterone inhibit cardiac fibroblast growth. *Hypertension*. 1998 Jan;31(1 Pt 2):522-8.

ELLISON GM, WARING CD, VICINANZA C, TORELLA D. Physiological cardiac remodeling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms. *Heart*. 2012; v. 98, p. 5-10, 2012.

ER F, MICHELS G, BRANDT MC, KHAN I, HAASE H, EICKS M, LINDNER M, HOPPE UC. Impact of testosterone on cardiac L-type calcium channels and Ca²⁺ sparks: acute actions antagonize chronic effects. *Cell Calcium*. 2007 May;41(5):467-77.

ER F, GASSANOV N, BRANDT MC, MADERSHAHIAN N, HOPPE UC. Impact of dihydrotestosterone on L-type calcium channels in human ventricular cardiomyocytes. *Endocr Res*. 2009; 34:59–67.

ESTRADA M, ESPINOSA A, MULLER M, JAIMOVICH E. Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. *Endocrinology*. 2003; 144:3586–3597.

EVANS NA. Current concepts in anabolic-androgenic steroids. *Am J Sports*

Med. 2004 Mar;32(2):534-42.

FABIATO A. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* 1985; 85:247–289.

FALKENSTEIN E, TILLMANN HC, CHRIST M, FEURING M, WEHLING M. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacological Reviews*. 2000; v. 52, n^o 4, p. 513-556.

FANTON L, BELHANI D, VAILLANT F, TABIB A, GOMEZ L, DESCOTES J, DEHINA L, BUI-XUAN B, MALICIER D, TIMOUR Q. Heart lesions associated with anabolic steroid abuse: comparison of post-mortem findings in athletes and norethandrolone-induced lesions in rabbits. *Exp Toxicol Pathol*. 2009 Jul;61(4):317-23.

FERNANDES T, SOCI UPR, OLIVEIRA EM. Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: MicroRNAs and molecular determinants. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2011; v. 44, n^o 9, p. 836-847.

FERREIRA JC, MOREIRA JB, CAMPOS JC, PEREIRA MG, MATTOS KC, COELHO MA, BRUM PC. Angiotensin receptor blockade improves the net balance of cardiac Ca(2+) handling-related proteins in sympathetic hyperactivity-induced heart failure. *Life Sci*. 2011 Mar 28;88(13-14):578-85.

FINESCHI V, RIEZZO I, CENTINI F, SILINGARDI E, LICATA M, BEDUSCHI G, KARCH SB. Sudden cardiac death during anabolic steroid abuse: morphologic and toxicologic findings in two fatal cases of bodybuilders. *Int J Legal Med*. 2007 Jan;121(1):48-53.

FINESCHI V, BAROLDI G, MONCIOTTI F, PAGLICCI REATTELLI L,

TURILLAZZI E. Anabolic steroid abuse and cardiac sudden death: a pathologic study. *Archives of Pathology and Laboratorial Medicine*. 2001; v. 125, p. 253-255.

FORADORI CD, WEISER MJ, HANDA RJ. Non-genomic actions of androgens. *Front Neuroendocrinol*. 2008 May;29(2):169-81.

FRANQUNI JVM, NASCIMENTO AM, LIMA EM, BRASIL GA, HERINGER OA, CASSARO KOS, CUNHA TVP, MUSSO C, SANTOS MCLFS, KALIL IC, ENDRINGER DC, BOËCHAT GAP, BISSOLI NS, ANDRADE TU. Nandrolone decanoate determines cardiac remodeling and injury by an imbalance in cardiac inflammatory cytokines and ACE activity, blunting of the Bezold-Jarisch reflex, resulting in development of hypertension. *Steroids*. 2013; v. 78, p. 379-385.

FRATI P, BUSARDÒ FP, CIPOLLONI L, DOMINICIS ED, FINESCHI V. Anabolic Androgenic Steroid (AAS) related deaths: autoptic, histopathological and toxicological findings. *Curr Neuropharmacol*. 2015 Jan;13(1):146-59.

FRATI P, BUSARDÒ FP, CIPOLLONI L, De DOMINICIS E, FINESCHI V. Anabolic Androgenic Steroid (AAS) Related Deaths: Autoptic, Histopathological and Toxicological Findings. *Current Neuropharmacology*. 2015; v. 13, nº 1, p. 146-159.

FRAYSSE B, ROUAUD T, MILLOUR M, FONTAINE-PÉRUS J, GARDAHAUT MF, LEVITSKY DO. Expression of the Na(+)/Ca(2+) exchanger in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Jan;280(1):C146-54.

FREY N, KATUS HA, OLSON EN, HILL JA. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation*. 2004 Apr 6;109(13):1580-9.

FUSTER V, ALEXANDER RW, O'ROURKE RA, ROBERTS R, KING SB, WELLENS HJJ. In *Hurst's the heart*. 10th edition, p 119 McGraw- Hill, USA, 2001.

GARCIA JA, INCERPI EK. Factors and mechanisms involved in left ventricular hypertrophy and the anti-hypertrophic role of nitric oxide. *Arq Bras Cardiol*.

2008 Jun;90(6):409-16.

GARDNER JD, BROWER GL e JANICKI JS. Gender differences in cardiac remodeling secondary to chronic volume overload. *J Card Fail.* 2002 Apr;8(2):101-7.

GEREZ JR, FREI F, CAMARGO IC. Histological assessment of ovaries and uterus of rats subjected to nandrolone decanoate treatment. *Contraception.* 2005

Jul;72(1):77-80. GHORBANI BARAVATI H, JOUKAR S, FATHPOUR H, KORDESTANI Z. Nandrolone Plus Moderate Exercise Increases the Susceptibility to Lethal Arrhythmias. *Res Cardiovasc Med.* 2015 May 23;4(2):e26233.

GOLDEN KL, MARSH JD, JIANG Y. Castration reduces mRNA levels for calcium regulatory proteins in rat heart. *Endocrine.* 2002 Dec;19(3):339-44.

GOLDEN KL, MARSH JD, JIANG Y. Testosterone regulates mRNA levels of calcium regulatory proteins in cardiac myocytes. *Horm Metab Res.* 2004 Apr;36(4):197-202.

GORDON CM, GLOWACKI J, LEBOFF MS. DHEA and the skeleton (through the ages). *Endocrine.* 1999 Aug;11(1):1-11.

GRACE F, SCULTHORPE N, BAKER J, DAVIES B. Blood pressure and rate pressure product response in males using high-dose anabolic androgenic steroids (AAS). *J Sci Med Sport.* 2003 Sep;6(3):307-12.

GROGAN S. Body image and health: contemporary perspectives. *J Health Psychol.* 2006 Jul;11(4):523-30.

GRUBER AJ, POPE HG JR. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use in women. *Psychother Psychosom.* 2000; 69(1):19-26.

HAGHIGHI K, SCHMIDT AG, HOIT BD, BRITTSAN AG, YATANI A, LESTER JW, ZHAI J, KIMURA Y, DORN GW 2ND, MACLENNAN DH, KRANIAS EG. Superinhibition of sarcoplasmic reticulum function by phospholamban induces

cardiac contractile failure. *J Biol Chem.* 2001 Jun 29;276(26):24145-52.

HAJJAR RJ, SCHMIDT U, MATSUI T, GUERRERO JL, LEE KH, GWATHMEY JK, DEC GW, SEMIGRAN MJ, ROSENZWEIG A. Modulation of ventricular function through gene transfer in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 28;95(9):5251-6.

HANDA JR, PRICE RH. Androgen Action. In: FINK, G., ed. *Encyclopedia of stress.* New York: Academic Press. 2000; v.1, p.183-188.

HART G. Exercise-induced cardiac hypertrophy: a substrate for sudden death in athletes? *Exper Physiol.* 2003; 85:639-44.

HARTGENS, F; KUIPERS, H. Effects of Androgenic-Anabolic Steroids in Athletes. *Sports Medicine.* 2004; v. 34, n° 8, p. 513-554, 2004.

HASENFUSS, G. Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 1998; 37, 279–289.

HASSAN NA, SALEM MF, SAYED MA. Doping and effects of anabolic androgenic steroids on the heart: histological, ultrastructural, and echocardiographic assessment in strength athletes. *Hum Exp Toxicol.* 2009 May;28(5):273-83.

HASSAN AF, KAMAL MM. Effect of exercise training and anabolic androgenic steroids on hemodynamics, glycogen content, angiogenesis and apoptosis of cardiac muscle in adult male rats. *International Journal of Health Sciences.* 2013; v. 7, n° 1, p. 47- 60.

HAYASHI T, MARTONE ME, YU Z, THOR A, DOI M, HOLST MJ, ELLISMAN MH, HOSHIJIMA M. Threedimensional electron microscopy reveals new details of membrane systems for Ca²⁺ signaling in the heart. *J Cell Sci.* 2009, 122:1005–1013.

HAYWARD CS, KALNINS WV, KELLY RP. Gender-related differences in left ventricular chamber function. *Cardiovasc Res.* 2001 Feb 1;49(2):340-50.

HOBBS CJ, JONES RE, PLYMATE SR. Nandrolone, a 19-nortestosterone, enhances insulin-independent glucose uptake in normal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Apr;81(4):1582-5.

HOBBS CJ, JONES RE, PLYMATE SR. Nandrolone, a 19-nortestosterone, enhances insulin-independent glucose uptake in normal men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1996; v. 81, n° 4, p. 1582-1585.

JALIL JE, DOERING CW, JANICKI JS, PICK R, SHROFF SG, WEBER KT. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ Res.* 1989 Jun;64(6):1041-50.

JANICKI JS, BROWER GL. The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function. *J Card Fail.* 2002 Dec;8(6 Suppl):S319-25.

JESSUP JA, WANG H, MACNAMARA LM, PRESLEY TD, KIM-SHAPIRO DB, ZHANG L, CHEN AF, GROBAN L. Estrogen therapy, independent of timing, improves cardiac structure and function in oophorectomized mRen2.Lewis rats. *Menopause.* 2013 Aug;20(8):860-8.

KADI F, BONNERUD P, ERIKSSON A, THORNELL LE. The expression of androgen receptors in human neck and limb muscles: effects of training and self-administration of androgenic-anabolic steroids. *Histochem Cell Biol.* 2000 Jan;113(1):25-9.

KAPLAN NM. Systemic hypertension: mechanisms and diagnosis. In: Braunwald E, Zipes DP, Libby P. eds. *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine.* Philadelphia: Saunders Company. 2001; p. 941-71.

KATZ AM. Molecular basis of calcium channel blockade. *Am J Cardiol.* 1992 Apr 30;69(13):17E-22E.

KEMI OJ, LOENNECHEN JP, WISLØFF U, ELLINGSEN Ø. Intensity-

controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* (1985). 2002 Oct; 93(4):1301-9.

KICMAN AT. Pharmacology of anabolic steroids. *British Journal of Pharmacology*. 2008; v. 154, n° 3, p. 502-521.

KOKKEVI A, FOTIOU A, CHILEVA A, NOCIAR A, MILLER P. Daily exercise and anabolic steroids use in adolescents: a cross-national European study. *Subst Use Misuse*. 2008 Dec; 43(14):2053-65.

KOSS KL, PONNIAH S, JONES WK, GRUPP IL, KRANIAS EG. 1995. Differential phospholamban gene expression in murine cardiac compartments. Molecular and physiological analyses. 1995; *Circ. Res.* 77(2): 342–353.

KOUSTENI S, BELLIDO T, PLOTKIN LI, O'BRIEN CA, BODENNER DL, HAN L, HAN K, DIGREGORIO GB, KATZENELLENBOGEN JA, KATZENELLENBOGEN BS, ROBERSON PK, WEINSTEIN RS, JILKA RL, MANOLAGAS SC. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*. 2001 Mar 9;104(5):719-30.

KRAEMER WJ, RATAMESS NA, FRENCH DN. Resistance training for health and performance. *Curr Sports Med Rep*. 2002 Jun;1(3):165-71.

KUHN CM. Anabolic steroids. Recent progress in hormone research. 2002; v. 57, p. 411-34.

KUIPERS H, WIJNEN JA, HARTGENS F, WILLEMS SM. Influence of anabolic steroids on body composition, blood pressure, lipid profile and liver functions in body builders. *Int. J. Sports Med.*, Stuttgart. 1991; v.12, n.4, p.413- 418.

KUTSCHER EC, LUND BC, PERRY PJ. Anabolic steroids: A review for the clinician. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*. 2002; v. 32, n. 5, p. 285-96.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

LEITE-MOREIRA AF, GILLEBERT TC. Nonuniform course of left ventricular pressure fall and its regulation by load and contractile state. *Circulation*. 1994 Nov;90(5):2481-91.

LEOSCO D, IACCARINO G, CIPOLLETTA E, DE SANTIS D, PISANI E, TRIMARCO V, FERRARA N, ABETE P, SORRIENTO D, RENGO F, TRIMARCO B. Exercise restores beta-adrenergic vasorelaxation in aged rat carotid arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Jul;285(1):H369-74.

LEVIN ER. Minireview: extranuclear steroid receptors: roles in modulation of cell functions, *Mol. Endocrinol*. 2011; 25:377–384.

LEVITZKI A. From epinephrine to cyclic AMP. *Science*. 1988; 241(4867): 800–806.

LIMA EM, NASCIMENTO AM, BRASIL GA, KALIL IC, LENZ D, ENDRINGER DC, ANDRADE TU, BISSOLI NS. Cardiopulmonary reflex, cardiac cytokines, and nandrolone decanoate: response to resistance training in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2015 Nov;93(11):985-91.

LIN AL, MCGILL HC JR, SHAIN SA. Hormone receptors of the baboon cardiovascular system. Biochemical characterization of myocardial cytoplasmic androgen receptors. *Circ Res*. 1981 Oct;49(4):1010-6.

LIPS DJ, DE WINDT LJ, VAN KRAAIJ DJ, DOEVENDANS PA. Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur Heart J* 2003; 24:883-96.

LISE ML, DA GAMA E SILVA TS, FERIGOLO M, BARROS HM. [Abuse of anabolic-androgenic steroids in sports]. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 1999 Oct-

Dec;45(4):364-70.

LITTLE WC. Assessment of normal and abnormal cardiac function. In: Braunwald, Zipes, Libby, editors. Heart disease: A text book of cardiovascular medicine. 6. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 2001; pp. 479–502.

LIU PY, DEATH AK, HANDELSMAN DJ. Androgens and cardiovascular disease. *Endocr Rev.* 2003 Jun;24(3):313-40.

LOMPRÉ AM, ANGER M, LEVITSKY D. Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps in the cardiovascular system: function and gene expression. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1994; 26(9): 1109–1121.

LORELL BH. Significance of diastolic dysfunction of the heart. *Annu Rev Med.* 1991; 42:411-36.

LORELL BH, CARABELLO BA. Left Ventricular Hypertrophy Pathogenesis, Detection, and Prognosis. *Circulation.* 2000; v. 102, nº 4, p. 470-479.

MACLENNAN DH, KRANIAS EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003; 4(7): 566–577

MADY C, IANNI BM, ARTEAGA E, MONTES GS, CALDINI EG, ANDRADE G, GIORGI MC, SALDIVA PH. Relation between interstitial myocardial collagen and the degree of clinical impairment in Chagas' disease. *American Journal of Cardiology.* 1999 Aug 1;84(3):354-6, A9.

MAIOR AS, CARVALHO AR, MARQUES-NETO SR, MENEZES P, SOARES PP, NASCIMENTO JH. Cardiac autonomic dysfunction in anabolic steroid users. *Scand J Med Sci Sports.* 2013 Oct;23(5):548-55.

MALARKEY WB, STRAUSS RH, LEIZMAN DJ, LIGGETT M, DEMERS LM. Endocrine effects in female weight lifters who self-administer testosterone and anabolic steroids. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 1991; v. 165, nº

5, p. 1385-1390.

MANN N, ROSENZWEIG A. Can exercise teach us how to treat heart disease? *Circulation*. 2012; v. 126, p. 2625-2635.

MARCONDES FK, BIANCHI FJ, TANNO AP. Determination of the Estrous Cycle Phases of Rats: Some Helpful Considerations. *Brazilian Journal of Biology*. 2002; v. 62, p. 609-614.

MARQUES-NETO SR, FERRAZ EB, RODRIGUES DC, NJAINE B, RONDINELLI E, CAMPOS DE CARVALHO AC, NASCIMENTO JH. AT1 and aldosterone receptors blockade prevents the chronic effect of nandrolone on the exercise-induced cardioprotection in perfused rat heart subjected to ischemia and reperfusion. *Cardiovascular drugs and therapy*. 2014; v. 28, p. 125-135.

MARSH JD, LEHMANN MH, RITCHIE RH, GWATHMEY JK, GREEN GE, SCHIEBINGER RJ. Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes *Circulation*. 1998; 98:256–61.

MATSUBARA LS, MATSUBARE BB, OKOSHI MP, CICOGNA AC, JANICKI JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 279: 1534-9.

MCELROY CL, GISSEN SA, FISHBEIN MC. Exercise-induced reduction in myocardial infarct size after coronary artery occlusion in the rat. *Circulation*. 1978; 57(5):958-62.

MCGILL HC, JR, ANSELMO VC, BUCHANAN JM, SHERIDAN PJ. The heart is a target organ for androgen. *Science*. 1980; 207:775–7.

MCLENACHAN JM, DARGIE HJ. Ventricular arrhythmias in hypertensive left ventricular hypertrophy. Relationship to coronary artery disease, left ventricular dysfunction, and myocardial fibrosis. *Am J Hypertens*. 1990; 3(10): 735-40.

MEDEI E, MAROCOLO M, RODRIGUES DDE C, ARANTES PC, TAKIYA CM, SILVA J, RONDINELLI E, GOLDENBERG RC, DE CARVALHO AC, NASCIMENTO JH. Chronic treatment with anabolic steroids induces ventricular repolarization disturbances: cellular, ionic and molecular mechanism. *J Mol Cell Cardiol.* 2010 Aug;49(2):165-75.

MEDUGORAC I. Characterization of intramuscular collagen in mammalian left ventricle. *Basic Research in Cardiology* 1982; v. 77, nº 6, p. 589-598.

MELCHERT RB, WELDER AA. Cardiovascular effects of androgenic-anabolic steroids. *Med Sci Sports Exerc.* 1995 Sep;27(9):1252-62.

MERCIER I, COLOMBO F, MADER S, CALDERONE A. Ovarian hormones induce TGF-beta(3) and fibronectin mRNAs but exhibit a disparate action on cardiac fibroblast proliferation. *Cardiovasc Res.* 2002 Feb 15;53(3):728-39.

MICHELS G, ER F, EICKS M, HERZIG S, HOPPE UC. Long-term and immediate effect of testosterone on single T-type calcium channel in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology.* 2006 Nov;147(11):5160-9.

MIHL C, DASSEN WR, KUIPERS H. Cardiac remodelling: concentric versus eccentric hypertrophy in strength and endurance athletes. *Neth Heart J.* 2008. Apr;16(4):129-33.

MIHL C, DASSEN WRM, KUIPERS H. Cardiac remodelling: concentric versus eccentric hypertrophy in strength and endurance athletes. *Netherlands Heart Journal.* 2008; v. 16, nº 4, p. 129-133.

MILLER KE, HOFFMAN JH, BARNES GM, SABO D, MELNICK MJ, FARRELL MP. Adolescent anabolic steroid use, gender, physical activity, and other problem behaviors. *Subst Use Misuse.* 2005; 40(11):1637-57.

MINAMISAWA S, HOSHIJIMA M, CHU G, WARD CA, FRANK K, GU Y,

MARTONE ME, WANG Y, ROSS J JR, KRANIAS EG, GILES WR, CHIEN KR. Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell*. 1999 Oct 29;99(3):313-22.

MITCHELL JR, WANG JJ. Expanding application of the Wiggers diagram to teach cardiovascular physiology. *Adv Physiol Educ*. 2014; Jun;38(2):170-5.

MIYAKODA G, YOSHIDA A, TAKISAWA H, NAKAMURA T. Beta-Adrenergic regulation of contractility and protein phosphorylation in spontaneously beating isolated rat myocardial cells. *JBiochem*. 1987;102: 211-224.

MONTES GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int*. 1996; 20: 15-27.

MORAES MR, BACURAU RF, CASARINI DE, JARA ZP, RONCHI FA, ALMEIDA SS, HIGA EM, PUDO MA, ROSA TS, HARO AS, BARROS CC, PESQUERO JB, WÜRTELE M, ARAÚJO RC. Chronic conventional resistance exercise reduces blood pressure in stage 1 hypertensive men. *Journal of Strength Conditional Research*. 2012; v. 26, nº 4, p.1122-1129.

NADAL-GINARD B, MAHDAVI V. Molecular basis of cardiac performance. Plasticity of the myocardium generated through protein isoform switches. *J Clin Invest*. 1989 Dec;84(6):1693-700.

NAKAYAMA Y, SHIMIZU G, HIROTA Y, SAITO T, KINO M, KITaura Y, KAWAMURA K. Functional and histopathologic correlation in patients with dilated cardiomyopathy: an integrated evaluation by multivariate analysis. *J Am Coll Cardiol*. 1987 Jul;10(1):186-92.

NASCIMENTO JH, MEDEI E. Cardiac effects of anabolic steroids: hypertrophy, ischemia and electrical remodelling as potential triggers of sudden

death. *Mini Rev Med Chem*. 2011 May;11(5):425-9.

NEVES VJ, TANNO AP, CUNHA TS, FERNANDES T, GUZZONI V, Da SILVA CA, OLIVEIRA EM, MOURA MJCS, MARCONDES FK. Effects of nandrolone and resistance training on the blood pressure, cardiac electrophysiology, and expression of atrial β -adrenergic receptors. *Life Sciences*. 2013; v. 92, nº 20-21, p. 1029-1035.

NORMAN AW, MIZWICKI MT, NORMAN DP. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Jan;3(1):27-41.

NORTON GR, TRIFUNOVIC B, WOODIWISS AJ. Attenuated beta-adrenoceptor-mediated cardiac contractile responses following androgenic steroid administration to sedentary rats. *European Journal of Applied Physiology*. 2000; v. 81, nº 4, p. 310-316.

ODERMATT A, TASCHNER PE, SCHERER SW, BEATTY B, KHANNA VK, CORNBLATH DR, CHAUDHRY V, YEE WC, SCHRANK B, KARPATI G, BREUNING MH, KNOERS N, MACLENNAN DH. Characterization of the gene encoding human sarcolipin (SLN), a proteolipid associated with SERCA1: absence of structural mutations in five patients with Brody disease. *Genomics*. 1997 Nov 1;45(3):541-53.

OKOSHI K, RIBEIRO HB, OKOSHI MP, MATSUBARA BB, GONÇALVES G, BARROS R, CICOGNA AC. Improved systolic ventricular function with normal myocardial mechanics in compensated cardiac hypertrophy. *Jpn Heart J*. 2004; Jul;45(4):647-56.

OLIVARES EL, SILVEIRA AL, FONSECA FV, SILVA-ALMEIDA C, CÔRTEZ RS, PEREIRA-JUNIOR PP, NASCIMENTO JH, REIS LC. Administration of an anabolic steroid during the adolescent phase changes the behavior, cardiac

autonomic balance and fluid intake in male adult rats. *Physiol Behav.* 2014 Mar 14; 126:15-24.

OLIVETTI G, CIGOLA E, MAESTRI R, LAGRASTA C, CORRADI D, QUAINI F. Recent advances in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2000; 45: 68-75.

ONAKOMAIYA MM, HENDERSON LP. Mad men, women and steroid cocktails: a review of the impact of sex and other factors on anabolic androgenic steroids effects on affective behaviors. *Psychopharmacology.* 2016; v. 233, n^o4, p. 549-569.

ORCHARD C, BRETTE F. t-Tubules and sarcoplasmic reticulum function in cardiac ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 2008 Jan 15;77(2):237-44.

OZDEMIR O, BOZKURT I, OZDEMIR M, YAVUZ O. Side effect of metenolone enanthate on rats heart in puberty: morphometrical study. *Exp Toxicol Pathol.* 2013 Sep;65(6):745-50.

PARKER TG, SCHNEIDER MD. Growth factors, proto-oncogenes, and plasticity of the cardiac phenotype. *Annu Rev Physiol.* 1991; 53:179-200.

PARKS RJ, HOWLETT SE. Sex differences in mechanisms of cardiac excitation-contraction coupling. *Pflugers Arch.* 2013 May;465(5):747-63.

PEREIRA-JUNIOR PP, CHAVES EA, COSTA-E-SOUSA RH, MASUDA MO, DE CARVALHO AC, NASCIMENTO JH. Cardiac autonomic dysfunction in rats chronically treated with anabolic steroid. *Eur J Appl Physiol.* 2006 Mar; 96(5):487-94.

PERIASAMY M, BHUPATHY P, BABU GJ. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovasc Res.* 2008; Jan 15;77(2):265-73.

PERIASAMY M, KALYANASUNDARAM A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve.* 2007 Apr;35(4):430-42.

PERIASAMY M, REED TD, LIU LH, JI Y, LOUKIANOV E, PAUL RJ, NIEMAN ML, RIDDLE T, DUFFY JJ, DOETSCHMAN T, LORENZ JN, SHULL GE. Impaired cardiac performance in heterozygous mice with a null mutation in the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 2 (SERCA2) gene. *J Biol Chem.* 1999 Jan; 22;274(4):2556-62.

PINHO RA, ARAÚJO MC, GHISI GL, BENETTI M. [Coronary heart disease, physical exercise and oxidative stress]. *Arq Bras Cardiol.* 2010 Apr;94(4):549-55.

PLUIM BM, ZWINDERMAN AH, VAN DER LAARSE A, VAN DER WALL EE. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation.* 2000; 101: 336-344.

POGWIZD SM, SCHLOTTHAUER K, LI L, YUAN W, BERS DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: roles of sodium–calcium exchange, inward rectifier potassium current and residual b-adrenergic responsiveness. *Circ. Res.* 2001; 88, 1159–1167.

POWELL DW, MIFFLIN RC, VALENTICH JD, CROWE SE, SAADA JI, WEST AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol.* 1999 Jul;277(1 Pt 1):C1-9.

QI J, LIU YH. [Effects of sex hormones on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ - ATPase activity and gene expression in the genioglossal muscle of the aged rats]. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2007 Feb 18;39(1):60-3.

RABKIN JG, FERRANDO SJ, WAGNER GJ, RABKIN R. DHEA treatment for HIV+ patients: effects on mood, androgenic and anabolic parameters. *Psychoneuroendocrinology.* 2000 Jan;25(1):53-68.

RAKUSAN K. Left ventricular hypertrophy alterations in myocyte number, size, shape and structure. In: Scheridan DJ. (ed.) *Left ventricular hypertrophy.* London:

Churchill Livingstone. 1998; p. 23-8.

REGITZ-ZAGROSEK V, SEELAND U. Sex and gender differences in clinical medicine. *Handb Exp Pharmacol.* 2012;(214):3-22.

RICARD-BLUM S. The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2011;3(1):a004978.

RIEBE D, FERNHALL B, THOMPSON PD. The blood pressure response to exercise in anabolic steroid users. *Med Sci Sports Exerc.* 1992 Jun; 24(6):633-7.

ROCHA FL, CARMO EC, ROQUE FR, HASHIMOTO NY, ROSSONI LV, FRIMM C, ANÉAS I, NEGRÃO CE, KRIEGER JE, OLIVEIRA EM. Anabolic steroids induce cardiac renin-angiotensin system and impair the beneficial effects of aerobic training in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Dec;293(6):H3575-83.

RODRIGUES B, SANTANA AA, SANTAMARINA AB, OYAMA LM, CAPERUTO EC, DE SOUZA CT, BARBOZA CDE A, ROCHA LY, FIGUEROA D, MOSTARDA C, IRIGOYEN MC, LIRA FS. Role of training and detraining on inflammatory and metabolic profile in infarcted rats: influences of cardiovascular autonomic nervous system. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014:207131.

ROTHERMEL B, VEGA RB, YANG J, WU H, BASSEL-DUBY R, WILLIAMS RS. A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *J Biol Chem.* 2000 Mar 24;275(12):8719-25.

SAMUELS LT, HENSCHER AF, KEYS A. Influence of methyl testosterone on muscular work and creatine metabolism in normal young men. *J. Clin. Endocrinol. Metab., Bethesda,* 1942; v2, p.649-654.

SCHAIBLE TF, SCHEUER J. Comparison of heart function in male and female rats. *Basic Res Cardiol.* 1984 Jul-Aug;79(4):402-12.

SCHWARTZ N, VERMA A, BIVENS CB, SCHWARTZ Z, BOYAN BD. Rapid steroid hormone actions via membrane receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Sep;1863(9):2289-98.

SCHWERTZ DW, BECK JM, KOWALSKI JM, ROSS JD. Sex differences in the response of rat heart ventricle to calcium. *Biol Res Nurs*. 2004 Apr;5(4):286-98.

SEIDMAN JG, SEIDMAN C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell*. 2001; 104:557–567.

SHAHIDI NT. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clinical Therapeutics*. 2001; v. 23, n° 9, p. 1355–1390.

SHEFFIELD-MOORE M, URBAN RJ, WOLF SE, JIANG J, CATLIN DH, HERNDON DN, WOLFE RR, FERRANDO AA. Short-term oxandrolone administration stimulates net muscle protein synthesis in young men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Aug;84(8):2705-11.

SHEPHARD RJ, BALADY GJ. Exercise as cardiovascular therapy. *Circulation* 1999; 99:963e72.

SHIRWANY A, WEBER KT. Extracellular matrix remodeling in hypertensive heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48(1):97-8.

SILVA GJ, MOREIRA ED, PEREIRA AC, MILL JG, KRIEGER EM, KRIEGER JE. ACE gene dosage modulates pressure-induced cardiac hypertrophy in mice and men. *Physiol Genomics*. 2006 Nov 27;27(3):237-44.

SIMONSON E, KEARNS WM, ENGER M. Effects of methyl testosterone treatment on muscular performance and the central nervous system of older men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Bethesda. 1974; v.4, p.528-534.

SIRIANNI R, CAPPARELLI C, CHIMENTO A, PANZA S, CATALANO S,

LANZINO M, PEZZI V, ANDÒ S. Nandrolone and stanozolol upregulate aromatase expression and further increase IGF-I-dependent effects on MCF-7 breast cancer cell proliferation. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Nov 5;363(1-2):100-10.

SMITH SM, MYERS JH, KAPLAN HM. Catheterization of the left cardiac ventricle of the rat. *Lab Anim,* 1979; 13, 15-16.

SOELLER C, CANNELL MB. Examination of the transverse tubular system in living cardiac rat myocytes by 2- photon microscopy and digital image-processing techniques. *Circ Res* 1999; 84:266–275.

SØNDERGAARD EB, THUNE JJ, GUSTAFSSON F. Characteristics and outcome of patients with heart failure due to anabolic-androgenic steroids. *Scandinavian cardiovascular journal: SCJ.* 2014; v. 48, n. 6, p. 339-42.

STIMAC D, MILIĆ S, DINTINJANA RD, KOVAC D, RISTIĆ S. Androgenic/Anabolic steroid-induced toxic hepatitis. *J Clin Gastroenterol.* 2002 Oct;35(4):350-2.

STOLT A, KARILA T, VIITASALO M, MÄNTYSAARI M, KUJALA UM, KARJALAINEN J. QT interval and QT dispersion in endurance athletes and in power athletes using large doses of anabolic steroids. *Am J Cardiol.* 1999; 84(3):364-6.

SUGIZAKI MM, LEOPOLDO AP, CONDE SJ, CAMPOS DS, DAMATO R, LEOPOLDO AS, NASCIMENTO AF, OLIVEIRA JÚNIOR SDE A, CICOGNA AC. Upregulation of mRNA myocardium calcium handling in rats submitted to exercise and food restriction. *Arq Bras Cardiol.* 2011 Jul;97(1):46-52.

SULLIVAN ML, MARTINEZ CM, GENNIS P, GALLAGHER EJ. The cardiac toxicity of anabolic steroids. *Progress in Cardiovascular Diseases.* 1998; v. 41, n° 1, p. 1- 15.

TACHAUDOMDACH C, KANTACHUVESIRI S, WONGPRAPHAIROT S,

WORAWICHAWONG S, TANKEE P, RIENGROJPITAK S, KITTIYAKARA C. High Collagen I Gene Expression as an Independent Predictor of Adverse Renal Outcomes in Lupus Nephritis Patients with Preserved Renal Function. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2015; v. 139, p.378-387.

TADA M, KATZ AM. Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Annu Rev Physiol*. 1982; 44:401-23.

TADA M, KIRCHBERGER MA, LI HC. Phosphoprotein phosphatase-catalyzed dephosphorylation of the 22,000 dalton phosphoprotein of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Cyclic Nucleotide Res*. 1975; 1(5):329-38.

TADA M, KIRCHBERGER MA. Significance of the membrane protein phospholamban in cyclic AMP-mediated regulation of calcium transport by sarcoplasmic reticulum *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab*. 1976 May 26-29;11:265-72.

TANDON OP, CHINTALA R. Hypothalamo-pituitary-gonadal axis in control of female reproductive cycle. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2001 Oct;45(4):395-407.

TANNER SM, MILLER DW, ALONGI C. Anabolic steroid use by adolescents: prevalence, motives, and knowledge of risks. *Clinical journal of sport medicine: official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine*, 1995; v.5, p. 108-15.

TANNO AP, NEVES VJ, ROSA KT, CUNHA TS, GIORDANO FCL, CALIL CM, GUZZONI V, FERNANDES T, OLIVEIRA EM, NOVAES PD, IRIGOYEN MC, MOURA MJCS, MARCONDES FK. Nandrolone and resistance training induce heart remodeling: role of fetal genes and implications for cardiac pathophysiology, *Life Science*. 2011; v. 89, p. 631-637.

TERRY-MCEL RATH YM, O'MALLEY PM, JOHNSTON LD. Middle and high school drug testing and student illicit drug use: a national study 1998-2011. *J Adolesc*

Health. 2013; Jun;52(6):707-15.

THOMAS JD, FLACHSKAMPF FA, CHEN C, GUERERRO JL, PICARD MH, LEVINE RA, WEYMAN AE. Isovolumic relaxation time varies predictably with its time constant and aortic and left atrial pressures: implications for the noninvasive evaluation of ventricular relaxation. *Am Heart J.* 1992 Nov;124(5):1305-13.

TIRONE AP, ARTEAGA E, PEREIRA ADA C, KRIEGER JE, BUCK PDE C, IANNI BM, MADY C. [Research of markers for the genes of the heavy chain of cardiac beta-myosin and myosin binding protein C in relatives of patients with hypertrophic cardiomyopathy]. *Arq Bras Cardiol.* 2005 Jun;84(6):467-72.

TOTH M, ZAKÁR T. Relative binding affinities of testosterone, 19-nortestosterone and their 5 α -reduced derivatives to the androgen receptor and to other androgen-binding proteins: A suggested role of 5 α -reductive steroid metabolism in the dissociation of "myotropic" and ". *Journal of Steroid Biochemistry.* 1982; v. 17, p. 653-660.

TOYOFUKU T, KURZYDŁOWSKI K, TADA M, MACLENNAN DH. Identification of regions in the Ca(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum that affect functional association with phospholamban. *J Biol Chem.* 1993 Feb 5;268(4):2809-15.

TOYOSHIMA C, INESI G. Structural basis of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 2004; 73: 269–292.

TRIFUNOVIC B, NORTON GR, DUFFIELD MJ, AVRAAM P, WOODIWISS AJ. An androgenic steroid decrease left ventricular compliance in rats. *American Journal of Physiology.* 1995; v. 268, p. H1096-H1105.

TSIEN RW. Cyclic AMP and contractile activity in heart. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 1977; 8: 363–420.

TURILLAZZI E, PERILLI G, DI PAOLO M, NERI M, RIEZZO I, FINESCHI V. Side effects of AAS abuse: an overview. *Mini Rev Med Chem*. 2011 May;11(5):374-89.

TYLICKI A, KAWALKO A, SOKOLSKA J, STRUMILO S. Effect of anabolic steroid nandrolone decanoate on the properties of certain enzymes in the heart, liver, and muscle of rats, and their effect on rats' cardiac electrophysiology. *Horm Metab Res*. 2007 Apr; 39(4):268-72.

UNGERER M, BÖHM M, ELCE JS, ERDMANN E, LOHSE MJ. Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation*. 1993 Feb;87(2):454-63.

VAN DER VIES, J. On the Mechanism of Action of Nandrolone Phenylpropionate and Nandrolone Decanoate in Rats. *Acta Endocrinologica*. 1965; v. 49, n° 2, p. 271-282.

VASCONSUELO A, PRONSATO L, RONDA AC, BOLAND R, MILANESI L. Role of 17 β -estradiol and testosterone in apoptosis. *Steroids*. 2011; v. 76, n° 12, p. 1223- 1231.

VERBOOMEN H, WUYTACK F, DE SMEDT H, HIMPENS B, CASTEELS R. Functional difference between SERCA2a and SERCA2b Ca²⁺ pumps and their modulation by phospholamban. *Biochem J*. 1992 Sep 1;286 (Pt 2):591-5.

VERMA A, SOLOMON SD. Diastolic dysfunction as a link between hypertension and heart failure. *Med Clin North Am*. 2009 May;93(3):647-64.

VICENCIO JM, IBARRA C, ESTRADA M, CHIONG M, SOTO D, PARRA V, DIAZ-ARAYA G, JAIMOVICH E, LAVANDERO S. Testosterone induces an intracellular calcium increase by a nongenomic mechanism in cultured rat cardiac myocytes. *Endocrinology*. 2006; 147:1386–1395.

VILELA MG, SANTOS JÚNIOR JL, SILVA JGC. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. *Femina*. 2007; v. 35, n. 10, p. 667-670.

Volders PGA, Willems IEMG, Cleutjens JPM Arends JW, Havenith MG, Daemen MJ. Interstitial collagen is increased in the noninfarcted human myocardium after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25:1317-23.

VOLTARELLI FA, GOBATTO CA, De MELLO MAR. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2002; v. 35, nº 11, p. 1389-1394.

WAKATSUKI T, SCHLESSINGER J, ELSON EL. The biochemical response of the heart to hypertension and exercise. *Trends Biochem Sci* 2004; 29:609-17.

WANG M, YIP GW, WANG AY, ZHANG Y, HO PY, TSE MK. Peak early diastolic mitral annulus velocity by tissue Doppler imaging adds independent and incremental prognostic value. *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41: 820-6.

WANG YC, XIAO XL, LI N, YANG D, XING Y, HUO R, LIU MY, ZHANG YQ, DONG DL. Oestrogen inhibits BMP4-induced BMP4 expression in cardiomyocytes: a potential mechanism of oestrogen-mediated protection against cardiac hypertrophy. *Br J Pharmacol*. 2015 Dec;172(23):5586-95.

WEBER KT, JANICKI JS, SHROFF SG, PICK R, CHEN RM, BASHEY RI. Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ Res*. 1988; 62(4):757-65.

WEBER KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol*. 1989; 13(7):1637-52.

WEBER KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol* 2000a; 15:264-72.

WEBER KT. Targeting pathological remodeling: concepts of cardioprotection

and reparation. *Circulation*. 2000b; 102(12):1342-5.

WEEKS KL, MCMULLEN JR. The athlete's heart vs. the failing heart: can signaling explain the two distinct outcomes? *Physiology* 2011; 26:97e105

WEINER RB, BAGGISH AL. Exercise-induced cardiac remodeling. *Progress in cardiovascular diseases*. 2012; v. 54, n^o5, p. 380-386.

WIGHT JN JR, SALEM D. Sudden cardiac death and the 'athlete's heart'. *Arch Intern Med*. 1995 Jul 24;155(14):1473-80.

WILSON JD. Androgen abuse by athletes. *Endocr Rev*. 1988 May;9(2):181-99.

WILSON C, CONTRERAS-FERRAT A, VENEGAS N, OSORIO-FUENTEALBA C, PÁVEZ M, MONTOYA K, DURÁN J, MAASS R, LAVANDERO S, ESTRADA M. Testosterone increases GLUT4-dependent glucose uptake in cardiomyocytes. *J Cell Physiol*. 2013 Dec;228(12):2399-407.

WINSLOW RL, WALKER MA, GREENSTEIN JL. Modeling calcium regulation of contraction, energetics, signaling, and transcription in the cardiac myocyte. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016 Jan-Feb;8(1):37-67.

WITAYAVANITKUL N, WORANUSH W, BUPHA-INTR T, WATTANAPERMPPOOL J. Testosterone regulates cardiac contractile activation by modulating SERCA but not NCX activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013 Feb 1;304(3):H465-72.

WOO AY, XIAO RP. β -Adrenergic receptor subtype signaling in heart: from bench to bedside. *Acta Pharmacol Sin*. 2012 Mar;33(3):335-41.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Global recommendations on physical activity for health*. Geneva, Switzerland, 2010.

WU KD, LEE WS, WEY J, BUNGARD D, LYTTON J. Localization and

quantification of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoform transcripts. *Am J Physiol.* 1995 Sep;269(3 Pt 1):C775-84.

WU FC. Endocrine aspects of anabolic steroids. *Clin. Chem., Washington.* 1997; v.43, n.7, p.1289-1292.

YAMAMOTO K, MASUYAMA T, SAKATA Y, NISHIKAWA N, MANO T, HORI M. Prevention of diastolic heart failure by endothelin type A receptor antagonist through inhibition of ventricular structural remodeling in hypertensive heart. *J Hypertens.* 2002 Apr;20(4):753-61.

YAMAMOTO S, GREEFF K. Effect of intracellular sodium on calcium uptake in isolated guinea-pig diaphragm and atria. *Biochim Biophys Acta.* 1981 Aug 20;646(2):348-52.

YESALIS CE, COURSON SP, WRIGHT JE. History of anabolic steroid in sport and exercise. In: YESALIS, C.E., ed. *Anabolic steroids in sport and exercise.* Champaign: Human Kinetics, 1993; p.51-71.

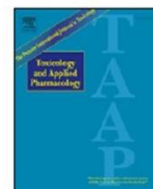
8 ANEXOS

Toxicology and Applied Pharmacology 301 (2016) 22–30



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology and Applied Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ytaap

Serca2a and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger are involved in left ventricular function following cardiac remodelling of female rats treated with anabolic androgenic steroid

Andrews Marques do Nascimento ^a, Ewelyne Miranda de Lima ^a, Girlandia Alexandre Brasil ^a, Izabela Facco Caliman ^a, Josiane Fernandes da Silva ^c, Virgínia Soares Lemos ^c, Tadeu Uggere de Andrade ^b, Nazaré Souza Bissoli ^{a,*}

^a Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil

^b Department of Pharmacy, University Vila Velha, Vila Velha, Espírito Santo, Brazil

^c Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2015

Revised 16 March 2016

Accepted 1 April 2016

Available online 10 April 2016

Keywords:

Nandrolone decanoate

Resistive exercise

Left ventricular hypertrophy

Cardiac function

SERCA2a

NCX

ABSTRACT

Anabolic-androgenic steroids are misused, including by women, but little is known about the cardiovascular effects of these drugs on women. Aim: To evaluate the effects of nandrolone decanoate (ND) and resistive physical exercise on cardiac contractility in young female rats. Main methods: Female Wistar rats were separated into 4 groups: C (untrained animals); E (animals were submitted to resistance exercise by jumping in water 5 times per week); ND (animals were treated with ND, 20 mg/kg/week for 4 weeks); and NDE (trained and treated). The haemodynamic parameters ($+\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$, $-\text{dP}/\text{dt}_{\text{min}}$ and Tau) were assessed in the left ventricle. The heart was collected for histological analyses and collagen deposition. The gastrocnemius muscle was weighed, and hypertrophy was assessed by the ratio of their weights to gastrocnemius/tibia length. The expression of calcium handling proteins was measured by western blot analysis. Results: ND treatment and physical exercise increased cardiac contractility and relaxation. In addition, ND promoted increases in phospholamban phosphorylated (p-PLB) and isoforms of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2a) expression, while resistive exercise increased the phosphorylation of PLB and expression of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers (NCX). Cardiac hypertrophy and collagen deposition were observed after ND treatment. Conclusion: Regulatory components of cytosolic calcium, such as SERCA2a and p-PLB, play important roles in modulating the contractility and relaxation effects of ND in females.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.



Nandrolone decanoate induces cardiac and renal remodeling in female rats, without modification in physiological parameters: The role of ANP system



Girlandia Alexandre Brasil^a, Ewelyne Miranda de Lima^a, Andrews Marques do Nascimento^a, Izabela Facco Caliman^a, Ana Raquel Santos de Medeiros^{a,b}, Mauro Sérgio Batista Silva^c, Gláucia Rodrigues de Abreu^a, Adelina Martha dos Reis^c, Tadeu Uggere de Andrade^d, Nazaré Souza Bissoli^{a,*}

^a Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

^b Biological and Health Sciences, Federal Institute of Espírito Santo, Vila Velha, ES, Brazil

^c Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Department of Pharmaceutical Sciences, University of Vila Velha, Vila Velha, ES, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 February 2015

Received in revised form 28 May 2015

Accepted 3 July 2015

Available online 10 July 2015

Keywords:

Nandrolone decanoate

Cardiovascular system

ANP

Resistive training

Sex hormones

ABSTRACT

Anabolic-androgenic steroids are misused, including women, but little is known about the cardiovascular effects of these drugs on females.

Aim: Evaluated the effects of nandrolone decanoate (ND), physical exercise and estrogen deficiency on female rats.

Main methods: Female Wistar rats were divided into 8 groups: S and OVX: (SHAM: sham surgery; OVX: ovariectomy, vehicle), SE and OVXE (resistance exercise 5 times a week, vehicle), SD and OVXD (treated with ND, 20 mg/kg/week for 4 weeks); SDE and OVXDE. Treatments were initiated 21 days after surgery. The Bezold–Jarisch reflex was assessed by Phenylbiguanide administration. The right atrium, kidney, and serum were collected for molecular analyses by RT-PCR of atrial natriuretic peptide (ANP), A-type natriuretic peptide receptor (NPR-A) and NPR-C. ELISA assay to estradiol and testosterone concentrations. The gastrocnemius muscle, heart and kidney weights/tibia length were measured. Morphometric analysis of heart was made (H/E) and collagen content of heart and kidney were evaluated using Picrosirius Red.

Key findings: ND treatment increased ANP expression on atrium and decreased NPR-A expression in kidney. Physical exercise and ovariectomy did not alter this parameter. NPR-C level was reduced in the SDE and OVXDE. Renal and cardiac hypertrophy was observed after ND treatment, with collagen deposition. Plasma estrogen concentrations were reduced and serum testosterone concentrations were increased after ND treatment. **Significance:** ANP has an important role in modulating the cardiovascular effects of ND in females. This modulating may have occurred by the increasing ANP expression, reducing NPR-A and NPR-C expression levels, and changing sex hormone levels.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.





Steroids

Available online 10 February 2017

In Press, Accepted Manuscript — Note to users



Long-term Treatment with Nandrolone Decanoate Impairs Mesenteric Vascular Relaxation in both Sedentary and Exercised Female Rats

Izabela F. Caliman^a,  , Cristian S. Bernabe^{b, c}, Antônio F. de Melo Jr.^a, Gírlândia A. Brasil^a, Andrews M. do Nascimento^a, Ewelyne M. de Lima^{a, d}, Suely G. Figueiredo^a, Tadeu U. de Andrade^d, Nazaré S. Bissoli^a

 [Show more](#)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2017.02.001>

[Get rights and content](#)

Highlights

- Nandrolone Decanoate (ND) impaired mesenteric vascular reactivity in female rats.
- ND-induced vascular alterations were likely mediated by a reduction of NO pathway.
- Exercise training did not improve the vascular alterations induced by ND treatment.
- ND led to vascular dysfunction similar to those found in ovariectomized female rats.